Année scolaire
1969 - 1970

N° 594

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

(MENTION PHARMACIE)

PAR

Teymour FAHIM-HEKMATI
PHARMACIEN
DIPLOMÉ DE PHARMACIE INDUSTRIELLE
né à SANANDADJ (Iran), le 24 Août 1934

Étude analytique et biochimique du métabolisme de quelques aminoacides

Présentée et soutenue publiquement le 23 Février 1970 devant la Commission d'Examen :

M. F. TAYEAU, Professeur	PRÉSIDENT
M. A. BAGHDIANTZ, Professeur associé	EXAMINATEURS
Mme J. SÉCHET, Maître de Conférences agrégé	
M. E. JOUZIER, Maître de Conférences agrégé	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0028

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS, F. TAYEAU.
DOYEN : M. H. BRICAUD. — **ASSESSEURS** : MM. J. MASQUELIER, J. RIVIÈRE, Cl. BERAUD.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, P. SIGALAS, G. PORTMANN, M. RIVIÈRE, R. GIRARD, C. PIFFAULT, R. FABRE, R. DUFOUR, P. FOURMENT, E. AUBERTIN, X. J. DUBECQ, L. MASSÉ, A. LACHAPÈLE, G. VITTE, J. DESPONS, G. DUBOURG, P. DELMAS-MARSALET.

MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ HONORAIRE : M. BERGER.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	
P. DERVILLÉE	Médecine légale et Médecine du travail.
R. MANDOUL	Zoologie et parasitologie.
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée.
J. REBOUL	Carcinologie.
P. MESNARD	Chimie organique et Chimie analytique.
R. GRANDPIERRE	Physiologie.
P. BROUSTET	Clinique médicale cardiologique.
N.	Clinique chirurgicale.
F. TAYEAU	Biochimie médicale A.
G. MAYER	Histologie et embryologie.
P. BLANQUET	Physique nucléaire appliquée et radiobiologie.
R. SARIC	Clinique médicale.
L. POUYANNE	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique.
J.-J. DUBARRY	Hydro-climatologie thérapeutique et clinique des maladies de l'appareil digestif.
F.-J. TRAISSAC	Clinique thérapeutique.
R. MAHON	Clinique d'accouchements.
R. PAUTRIZEL	Immunologie et biologie parasitaire.
Mlle G. ROUGIER	Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports.
G. MOUSTARDIER	Bactériologie.
E. BESSIÈRE	Clinique ophtalmologique.
H. LEGER	Anatomie pathologique.
J. MASQUELIER	Matière médicale.
G. MORETTI	Clinique médicale propédeutique et médecine tropicale.
N.	Clinique oto-rhino-laryngologique.
P. LAUMONIER	Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire.
J. LENG-LÉVY	Clinique médicale et des maladies infectieuses.
R. LETAC	Pathologie et recherche chirurgicales.
R. QUILICHINI	Pharmacie galénique.
E. NEUZIL	Biochimie médicale B.
R. STOLL	Biologie.
J. LANGE	Clinique urologique.
P. FRÉOUR	Hygiène et Clinique de pneumophtisiologie.
F. RIGAUD	Anatomie.
J. FAURE	Médecine expérimentale et physiopathologie.
N.	Clinique chirurgicale des maladies cardiaques.
J. VILLAR	Clinique gynécologique.
P. LE COULANT	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.
M. BERGOUIGNAN	Clinique neurologique.
J. DUHAMEL	Physique médicale et pharmaceutique.
R. BABIN	Pharmacie chimique.
H. CHOUSSAT	Pathologie médicale.
L. CHASTRUSSE	Clinique obstétricale.
P. VERGER	Clinique médicale des maladies des enfants.
F. LAPORTE	Chirurgie générale.
R. TINGAUD	Clinique chirurgicale.
H. LAUBIE	Botanique et cryptogamie.
Cl. RICHIR	Anatomie pathologique.
R. GOLSE	Chimie générale et Chimie minérale.
J. BAILENGER	Zoologie et biologie animale.
J.-Cl. COLLETER	Chimie analytique.
H. BRICAUD	Médecine générale.
P. BENOIT	Clinique odonto-stomatologique.
Cl. MARTIN-DUPONT	Clinique néphrologique
J. CANELLAS	Pharmacodynamie et hydrologie.
R. CANIVENC	Histologie.
G. DELORME	Electroradiologie.
J. DEPAULIS	Séméiologie chirurgicale.
J. RIVIÈRE	Séméiologie médicale.
H. DULONG DE ROSNAY	Bactériologie.
R. CROCKETT	Chimie organique et chimie analytique.
R. DARMAILLACQ	Chirurgie générale.
H. POUYANNE	Clinique neuro-chirurgicale.
R. CASTAING	Réanimation respiratoire et anesthésiologie.

PROFESSEUR ASSOCIÉ

M.	
A. BAGHDIANTZ	Physique et chimie (Pharmacie).

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	
J. DAVID-CHAUSSÉ	Médecine générale.
J. MARQUEVIELLE	Biochimie médicale.
M. BLANC	Neuro-psychiatrie.
Cl. MASSÉ	Chirurgie générale.
R. MARAUD	Histologie et embryologie.
P. DU PASQUIER	Bactériologie.
J. STAEFFEN	Médecine générale.
J.-P. DUBECQ	Obstétrique.
G. NEVERRE	Physiologie.
J. MEUNIER	Histologie.
A. SERISÉ	Hygiène.
P. FERRET-BOUIN	Physique médicale.
J. VIDEAU	Anatomie.
P. BLANCHOT	Médecine générale.
L. DOUTRE	Chirurgie générale.
P. LOISEAU	Neuro-psychiatrie.
Cl. VRIGNAUD	Physique pharmaceutique.
P. SOURREIL	Dermato-vénéréologie.

MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS :

MM.	
R. JENSEN	Chimie biologique.
J. BROUSSIN	Electroradiologie.
R. TESSIER	Pneumo-phtisiologie.
Mme J. SÉCHET	Biochimie médicale.
C. LAGARDE	Carcinologie.
C. BÉRAUD	Thérapeutique.
H. LAZARINI	Médecine légale et Médecine du travail.
J. SOUMIREU-MOURAT	Obstétrique.
G. CABANIEU	Médecine générale.
R. LE LOURD	Pneumo-phtisiologie.
L. COURAUD	Chirurgie générale.
J. BENTÉGEAT	Hématologie.
J. ROQUEBERT	Pharmacodynamie.
L. ARNÉ	Médecine générale et thérapeutique.
Cl. MARTIN	Pédiatrie.
R. BAUTE	Cryptogamie.
V. DARGELOS	Microbiologie.
Mlle S. LARCEBAU	Toxicologie.
M. GADRET	Chimie analytique.
C. WONÉ	Médecine générale et thérapeutique.
J. JULIEN	Médecine générale et thérapeutique.
J.-J. BATTIN	Pédiatrie.
M. DALLOCCHIO	Cardiologie et maladies vasculaires.
J. AUBERTIN	Maladies infectieuses.
P. VÉRIN	Ophtalmologie.
M. GOT	Neuro-chirurgie.
J. TAVERNIER	Electroradiologie : diagnostic et thérapeutique.
J. VINCENT	Physiologie et explorations fonctionnelles.
L. CHEVAIS	Anesthésiologie.
G. GILLARDEAU	Anesthésiologie.
J. HONTON	Orthopédie et traumatologie.
M. BOMBART	Orthopédie et traumatologie.
A. HUGUES	Cancérologie.
M. SABATHIÉ	Anesthésiologie.
E. JOUZIER	Chimie biologique (Pharmacie).
F. COUSTOU	Législation et déontologie pharmaceutique.

MAITRE DE CONFÉRENCES ASSOCIÉ

M.	
J. MOULINIER	Hématologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	
P. BIRBIS	Chirurgie générale.
J.-P. CALAMEL	Chirurgie générale.
L. TEXIER	Dermato-syphiligraphie.
R. GENESTE	Orthopédie.
F. FONTAN	Chirurgie générale.
J. LASSERRE	Orthopédie.

AGRÉGÉS LIBRES

MM.	
G. FAUGÈRE	Obstétrique.
M. L'ÉPÉE	Médecine légale.
H. CABANIÉ	Anatomie.
L. CORCELLE	Ophtalmologie.
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie
F. BALLANGER	Urologie.

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES :

MM.	
P. BONJEAN	Anatomie.
M. LAHOURCADE	Parasitologie.
M. SENTENAC	Anatomie.
G. DELMON	Anatomie pathologique.
J. TRIBOULEY	Immunologie, sérologie.
F.-X. MICHELET	Stomatologie.
L. PINSON	Oto-rhino-laryngologie.
F. COHADON	Neuro-chirurgie.
J.-Cl. ROQUES	Physique médicale.
P. ESCHAPASSE	Physique médicale.
J. PACCALIN	Médecine générale et thérapeutique.

Le Conseiller administratif, Chef des services administratifs
André ARGILAS.

L'Attaché d'administration universitaire, Directeur du cabinet :
Madame M. C. CHAPENOIRE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

Année scolaire
1969 - 1970

N° 594

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

(MENTION PHARMACIE)

PAR

Teymour FAHIM-HEKMATI
PHARMACIEN
DIPLOMÉ DE PHARMACIE INDUSTRIELLE
né à SANANDADJ (Iran), le 24 Août 1934

Étude analytique et biochimique du métabolisme de quelques aminoacides

Présentée et soutenue publiquement le 23 Février 1970 devant la Commission d'Examen:

M. F. TAYEAU, Professeur	PRÉSIDENT
M. A. BAGHDIANTZ, Professeur associé	EXAMINATEURS
Mme J. SÉCHET, Maître de Conférences agrégé	EXAMINATEURS
M. E. JOUZIER, Maître de Conférences agrégé	EXAMINATEURS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A MA FEMME

A MA FILLE

A MON FRERE DANECH *et* SA FAMILLE

A MON FRERE KHOSROW *et* MA BELLE-SOEUR

A MES SOEURS, A MES BEAUX-FRERES
et LEURS ENFANTS

A MA BELLE FAMILLE

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HONORAIRE G. VITTE

Professeur Honoraire de Pharmacie chimique et Pharmacodynamie
Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie
Pharmacien Honoraire des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre national du Mérite
Commandeur des Palmes académiques
Officier de la Santé publique
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Chevalier du Mérite agricole

Que nous remercions pour la bienveillance qu'il nous a toujours manifestée au cours de notre stage et au cours de nos études.

A MONSIEUR MARZAT

Docteur en Pharmacie
Chargé de Cours à la Faculté

En remerciement de tout ce qu'il nous a appris au cours du stage que nous avons effectué sous sa direction.

A SOEUR MARIE-VINCENT

Pharmacien

Nous lui exprimons notre profonde gratitude pour la bienveillance qu'elle nous a toujours témoignée.

A NOS MAITRES

DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

A NOS JUGES

Monsieur le Docteur E. JOUZIER

Maître de Conférences Agrégé de Chimie biologique

En remerciement de tout ce qu'il nous a appris tant du point de vue scientifique que du point de vue expérimental.

Madame le Docteur J. SECHET

Maître de Conférences Agrégé de Biochimie médicale
Biologiste des Hôpitaux
Chevalier des Palmes académiques

Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse.

Nous la prions de trouver ici l'expression de notre très respectueuse reconnaissance pour la bienveillance qu'elle nous a toujours témoignée.

Monsieur le Professeur A. BAGHDIANTZ

Professeur de Biochimie à l'Université de Téhéran
Professeur associé à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
Docteur ès Sciences
Officier de l'Ordre de la Couronne (Tadj, Iran)
Chevalier des Palmes académiques

Nous le remercions d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur F. TAYEAU

Doyen Honoraire de la Faculté de Médecine
et de Pharmacie
Professeur de Biochimie médicale A
Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Médecin biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Docteur ès Sciences
Officier de la Légion d'Honneur
Commandeur des Palmes académiques
Officier de l'Ordre national du Mérite
Chevalier de la Santé publique
Chevalier du Mérite agricole
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Officier du Mérite scientifique
Grand Croix de l'Ordre du Saint Sépulcre
Commandeur de l'Odre national Sénégalais
Commandeur de l'Ordre national Ivoirien
Titulaire de l'Ordre de Sapasse (1ère Classe) Iran
Titulaire 2ème degré de la décoration Danesche - Iran
Docteur Honoris Causa de l'Université de Téhéran - Iran

Vous vous êtes toujours intéressé à notre travail avec beaucoup de sollicitude. Vous nous faites maintenant le grand honneur d'accepter la présidence de notre thèse et nous tenons à vous assurer de notre très sincère gratitude et de notre profond respect.

ETUDE ANALYTIQUE ET BIOCHIMIQUE

DU METABOLISME DE QUELQUES AMINOACIDES

INTRODUCTION

La découverte d'une pathologie nouvelle due à des troubles du métabolisme des acides aminés est relativement récente . Depuis la description de la phénylcétonurie par FÖLLING, en 1934, ce domaine de la pathologie s'enrichit de jour en jour et l'on connaît maintenant de nombreuses erreurs du métabolisme , la plupart congénitales, dues à un déficit enzymatique. Certaines de ces affections étaient certes connues depuis de nombreuses années, telle l'alcaptonurie mise en évidence en 1858 par BODEKER, mais ce n'est que beaucoup plus tard que le trouble métabolique fut démontré . Ces erreurs du métabolisme sont extrêmement variées et, depuis une dizaine d'années, de nombreux cas ont été rapportés ; plus récemment encore, l'homocystinurie fut caractérisée en 1962 par CANSON et WEILL .

Un certain nombre de maladies métaboliques des acides aminés s'accompagne d'arriération mentale . La gravité du retard mental peut varier de la débilité légère à l'idiotie la plus marquée . Or, dès 1953, une notion fondamentale a été acquise grâce aux travaux de BICKEL : c'est la possibilité, par un régime approprié, non seulement de remédier aux conséquences de la maladie, mais encore de prévenir certains troubles mentaux. Cette notion essentielle a été le point de départ de la recherche et de la mise au point d'une multitude de tests et d'épreuves de dépistage .

Ces considérations nous ont amené à effectuer une étude systématique d'une série d'explorations fonctionnelles du métabolisme de certains acides aminés, particulièrement importants dans la pathologie infantile. Nous ne voudrions pas aborder le détail de nos recherches sans remercier tous ceux qui, par leur compétence et leur habileté technique, nous ont permis de réaliser ce travail . Après avoir terminé nos études de pharmacie, nous avons souhaité travailler sous la direction de Monsieur le Doyen TAYEAU, qui nous a toujours manifesté la plus grande bienveillance;son brillant enseignement nous avait passionné tout au long de nos années de Faculté et avait éveillé en nous le goût de la biochimie .

Lorsque nous lui avons fait part de notre désir d'effectuer des recherches biochimiques, il nous confia à son adjoint, Madame le Professeur agrégé SECHET. Madame SECHET nous proposa alors un travail qui se prêtait particulièrement bien à la recherche appliquée à la pathologie infantile et qui, pour cette raison, fut réalisé au laboratoire de biochimie de l'Hôpital des enfants.

Nous lui sommes très reconnaissant d'avoir bien voulu nous guider sur le sujet qui fait l'objet de ce travail et, en sollicitant son indulgence pour son imperfection, nous la prions de trouver ici un bien faible témoignage de notre gratitude .

Monsieur le Professeur MARQUEVIELLE nous a toujours accueilli avec la plus grande courtoisie et ses conseils nous ont été très précieux . Sa grande compétence dans le domaine de la biochimie, la rigueur de son esprit nous ont été d'un grand secours dans l'élaboration de ce travail . Mais notre gratitude s' adresse tout spécialement à Monsieur le Professeur agrégé JOUZIER, dont l'aide nous a été indispensable et particulièrement précieuse; grâce à sa grande compétence dans le domaine de l'expérimentation, nous avons pu mettre au point des techniques très délicates, en particulier dans notre travail de recherche expérimentale sur l'animal .

Mademoiselle le Professeur agrégé TIXIER nous a fait bénéficier de ses amples connaissances théoriques et techniques ; les conseils qu'elle a bien voulu nous prodiguer à maintes reprises ont été pour nous d'un très grand profit; qu'elle veuille bien en être profondément remerciée . Nous remercions également Madame ROULAUD de l'aide qu'elle nous a apportée ; nous lui sommes très reconnaissant d'avoir bien voulu nous initier à la chromatographie des acides aminés urinaires et d'avoir réalisé un grand nombre d'essais pour notre étude . Nous prions Messieurs les Professeurs VERGER et BATTIN de croire à notre très profonde gratitude pour la confiance qu'ils nous ont témoignée en nous confiant les dossiers des enfants malades et en nous chargeant des examens chimiques .

Que tous les membres du laboratoire de Chimie de l'Hôpital des enfants et du laboratoire de Biochimie veuillent bien croire à notre profonde reconnaissance pour l'accueil qu'ils nous ont réservé et leur précieuse collaboration .

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Chimie de l'Hôpital des enfants ; nous tenons à exprimer tous nos remerciements à Monsieur le Directeur Général PAUTRAT, car nous avons trouvé, dans le laboratoire, tous les éléments nécessaires à la réalisation de ce travail .

°°°

Le plan de notre travail est le suivant :

Après avoir rappelé brièvement les méthodes d'évaluation de l'amino-acidurie, nous avons décrit les méthodes de chromatographie et d'électrophorèse sur papier des acides aminés urinaires que nous avons utilisées (chapitre I) .

Dans un deuxième chapitre , nous avons étudié les perturbations du métabolisme de l'hydroxyproline et décrit les techniques d'exploration fonctionnelle de cet aminoacide ; dans ce cas particulier, nous avons réussi à mettre au point une technique particulièrement délicate, d'application très large en pathologie infantile .

Le troisième chapitre est consacré aux perturbations du catabolisme de l'histidine et nous décrivons une méthode de dosage de son dérivé de dégradation , l'acide formimino-glutamique (FIGLU) . Notre étude a été complétée par une expérimentation sur le lapin et l'exploration fonctionnelle de cet acide aminé a été réalisée sur l'animal par application du dosage mis au point précédemment .

Dans le quatrième chapitre, nous avons étudié les troubles du métabolisme du tryptophanne dans les insuffisances en vitamine B_6 .

Nous terminons par un cinquième chapitre consacré aux troubles du métabolisme de la phénylalanine et nous rapportons un cas de phénylcétonurie avec l'exploration fonctionnelle complète .

CHAPITRE I

TECHNIQUES D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE DES AMINO-ACIDES URINAIRES

Nous avons utilisé des techniques tout à fait classiques d'identification : chromatographie et électrophorèse sur papier (9) .

A / LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous avons suivi dans ses grandes lignes la technique décrite par DENT (15), (16), à qui revient le mérite d'avoir étendu l'application de la chromatographie sur papier à l'étude des urines . Cet auteur a ouvert ainsi la voie à la découverte de nombreuses encéphalopathies métaboliques .

1°- Prélèvement des urines

Les urines de vingt-quatre heures sont recueillies en présence de toluène . Il est préférable de les garder au frais au cours des vingt-quatre heures .

2°- Evaluation globale de l'aminoacidurie .

Nous utilisons la réaction colorimétrique à la ninhydrine selon la technique simplifiée de POLONOVSKI (77) . On calcule l'élimination des acides aminés dans les urines de vingt-quatre heures et par kilo de poids .

Réactifs :

- solution saturée de complexon dans l'alcool à 95°
- solution de ninhydrine à 2 p. 100 dans l'alcool à 95° saturé de complexon
- solution mère d'acides aminés :

A	Glycocolle		267 mg
	Benzoate de sodium		1 g
	HCl 0,07 N	q. s. p.	500 ml
B	Acide glutamique		525 mg
	Benzoate de sodium		1 g
	HCl 0,07 N	q. s. p.	500 ml

Mélanger à parties égales A et B et, au moment de l'emploi, neutraliser la solution mère en ajoutant 1 ml de soude normale pour 14,3 ml de solution .

Cette solution mère contient 0,1 mg de N aminé par ml .

Préparation de la gamme étalon :

La solution étalon neutralisée est diluée au vingtième dans l'alcool-complexon ; elle contient 5 µg par ml.

La gamme étalon est alors préparée selon le schéma suivant :

	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5µg
Etalon 1/20 (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Alcool 95° (ml)	1,4	1,3	1,2	1,1	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Ninhydrine (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Dosage :

Après centrifugation ou filtration, l'urine est d'abord diluée dans l'eau (1 ml d'urine + 5 ml d'eau), puis dans l'alcool (0,5 ml de la dilution précédente +10 ml d'alcool à 95°) . Après une nouvelle centrifugation, on prélève 1,5 ml du soluté alcoolique et on l'introduit dans un tube à essai avec 1,5 ml de ninhydrine . On coiffe tous les tubes d'un chapeau de verre renversé (condensateur) . On plonge tous les tubes (gamme et dosage) dans un bain-marie bouillant où on les maintient pendant une minute et 30 secondes . On refroidit brusquement dans l'eau froide .

Calcul :

N aminé (en mg par litre) = n x 84

n étant égal à la concentration du tube étalon de même couleur .
Exemple : si n est égal à 2, l'aminoacidurie sera de 2x84= 168 mg N aminé par litre .
Si l'aminoacidurie est très forte, la dilution initiale de l'urine, qui est de 1/6 n'est pas suffisante. Il faut la pousser plus loin et modifier les calculs en conséquence .

3°- Déminéralisation des urines .

Nous décrirons ici uniquement la méthode que nous avons utilisée pour ce travail, celle de BOULANGER et BISERTE (10) .

Les résines (Amberlite IR 120 ou Dowex 50) sont régénérées sous leur forme hydrogène par de l'acide chlorhydrique 2 N, puis lavées abondamment avec de l'eau distillée 30 g de cette résine sont mis en contact avec 50 ml d'urine filtrée . Le mélange est agité pendant une heure . Après lavage soigneux de la résine à l'eau distillée, les acides aminés (sauf la taurine) et les peptides, fixés sur la résine, sont élués par 50 ml d'ammoniaque 2 N au cours d'une nouvelle agitation de 30 minutes . L'éluat ammoniacal est évaporé à sec par un courant d'air froid .

Le résidu est repris par une quantité d'eau distillée variable selon la concentration de l'urine en acides aminés, de telle sorte que la solution contienne entre 2,5 g et 3,5 g d'acides aminés par litre .

Si par exemple, l'évaluation globale des amino-acides par la ninhydrine correspond à 420 mg par litre, les 50 ml d'urine mis au contact de la résine contiennent $\frac{420 \times 50}{1000}$ = 21 mg d'amino-acides .

Pour obtenir un extrait en contenant 3 g par litre, on reprendra le résidu par un volume d'eau distillée égal à $\frac{21 \times 1000}{3000}$ = 7 ml.

4°- Chromatographie bidimensionnelle.

Les chromatographies bidimensionnelles ascendantes ont été réalisées à l'aide de l'appareillage SHANDON (Paris-labo) qui permet, grâce à son support, de faire migrer 12 feuilles 20 cm x 20 cm en même temps . L'échantillon est déposé dans un angle de la feuille, à 3 cm de chacun des bords (figure 1)

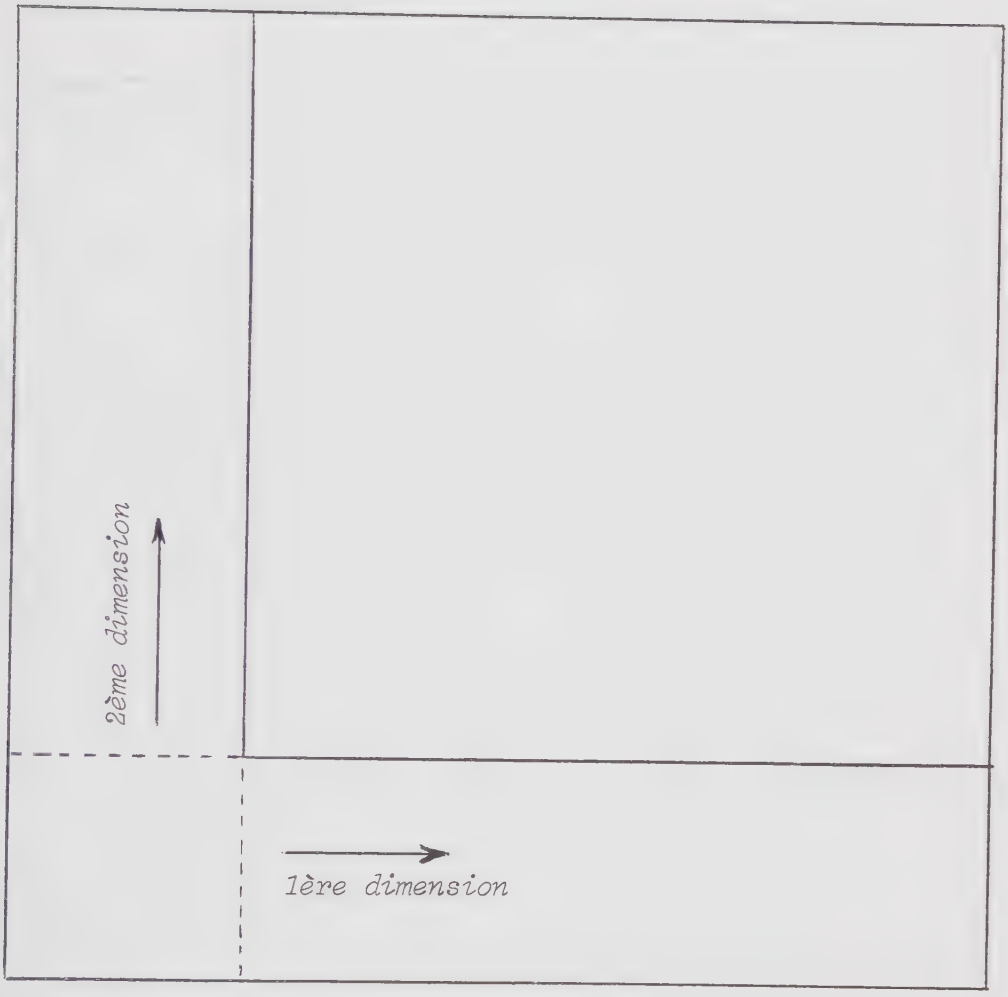


Figure 1

10 µg d'extrait sont déposés sur une feuille et 20 µg sur une deuxième feuille .

Les feuilles de papier sont placées dans une cuve contenant le solvant de PARTRIDGE (71) : Butanol, acide acétique, eau (4/1/5) . La migration dure environ 7 heures, puis on laisse sécher pendant une nuit .

La migration dans la deuxième dimension est réalisée avec le mélange : phénol, tampon borate de pH 9,3 (acide borique 0,1 N : 200 ml ; soude 0,1 N : 113 ml).

On arrête la migration lorsque le front du solvant arrive à 3 ou 4 cm du bord supérieur (5 à 6 heures). Puis on laisse sécher pendant une nuit . On révèle alors les acides aminés de la première feuille de papier en pulvérisant une solution de ninhydrine à 0,1 ou 0,2 p. cent dans l'acétone . Après chauffage pendant quelques minutes à 100°C , les acides aminés apparaissent sous forme de taches mauves sur fond blanc . (figure 2) .

. . . . .

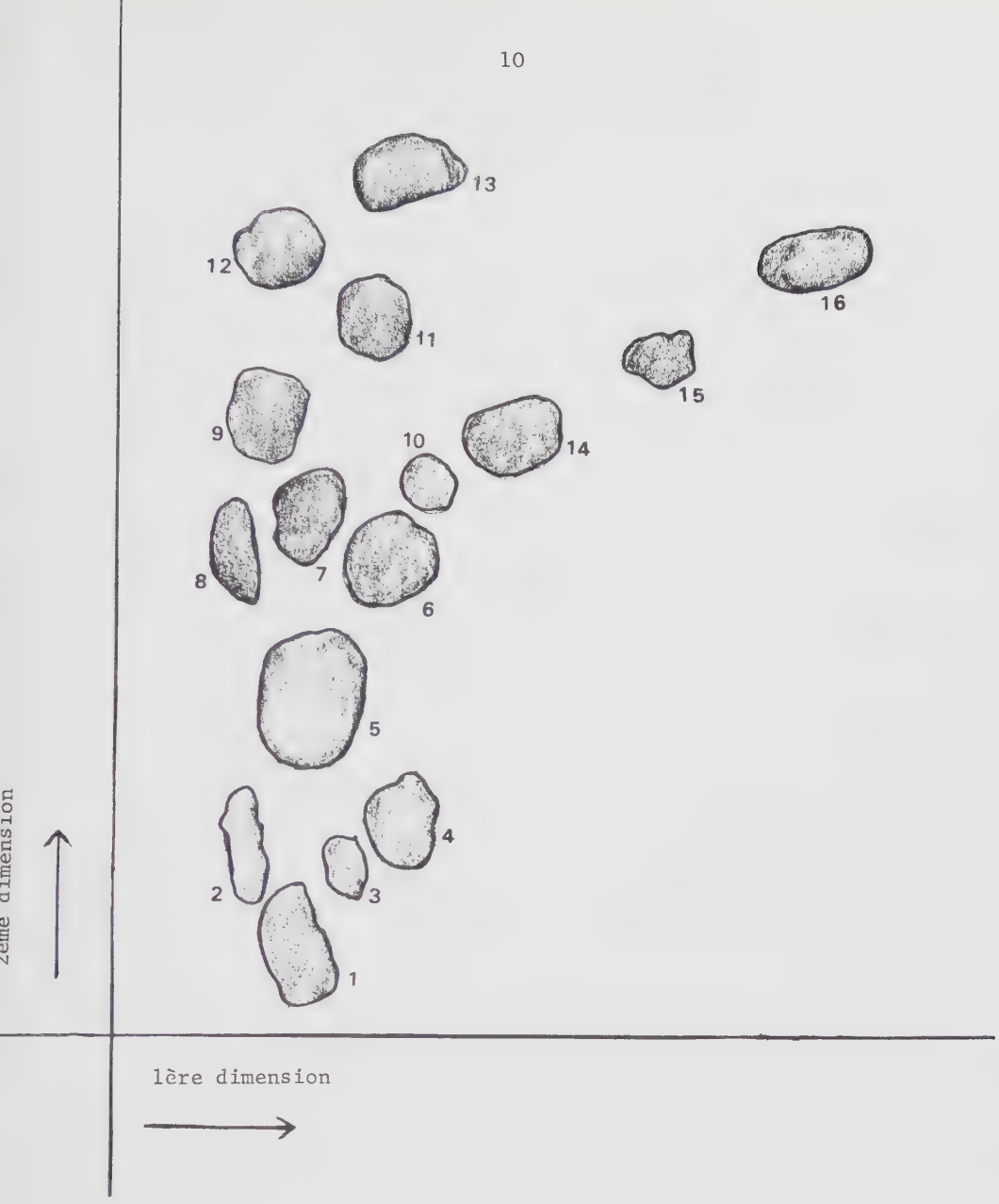


Figure 2 - Chromatographie des acides aminés urinaires.

1 - Acide aspartique.
2 - Cystéine.
3 - Acide glutamique.
4 - Acide α amino-adipique.
5 - Glycocolle.
6 - Alanine.
7 - Glutamine.
8 - Lysine.
9 - Histidine.
10 - β alanine.
11 - Sarcosine.
12 - Methyl-histidine.
13 - Proline.
14 - Acide β isobutyrique. (Tspot)
15 - Valine
16 - Phénylalanine.

La conservation de la coloration des chromatogrammes est très mauvaise. Il est possible de remédier, dans une certaine mesure, à cet inconvénient en pulvérisant après la révélation par la ninhydrine, le réactif de KAWEREAU (NO_3H à 10 p. 100 : 0,2 ml ; solution saturée de nitrate de cuivre : 1 ml; éthanol : 100 ml) qui donne une teinte rouge .

Il est possible de réaliser des réactions spécifiques pour un certain nombre d'acides aminés . Nous décrirons seulement la révélation des deux acides aminés que nous avons recherchés systématiquement , à savoir : la proline et l'hydroxyproline (qui donnent une coloration jaune pâle à la ninhydrine (69)).

Révélation de la proline :

Une solution d'isatine à 0,2 p. 100 dans du n-butanol contenant 4 p. 100 d'acide acétique est pulvérisée sur la feuille où ont été déposés 20 µl d'extrait urinaire . Après chauffage à l'étuve, la proline se colore en bleu vif ; l'hydroxyproline prend une teinte vert pâle et l'acide pipécolique prend également une teinte bleutée .

Révélation de l'hydroxyproline par le réactif de Jepson et Smith (37) :

Si, après le réactif à l'isatine, on pulvérise le réactif d' Ehrlich (solution à 1 p.100 de para-diméthylaminobenzaldéhyde dans de l'acétone contenant 10 p. 100 de ClH concentré), il apparaît une coloration rouge cerise intense, absolument spécifique de l'hydroxyproline . Cette réaction est très sensible et permet de déceler 0,1 µg d'hydroxyproline par cm^2 (figure 3) .

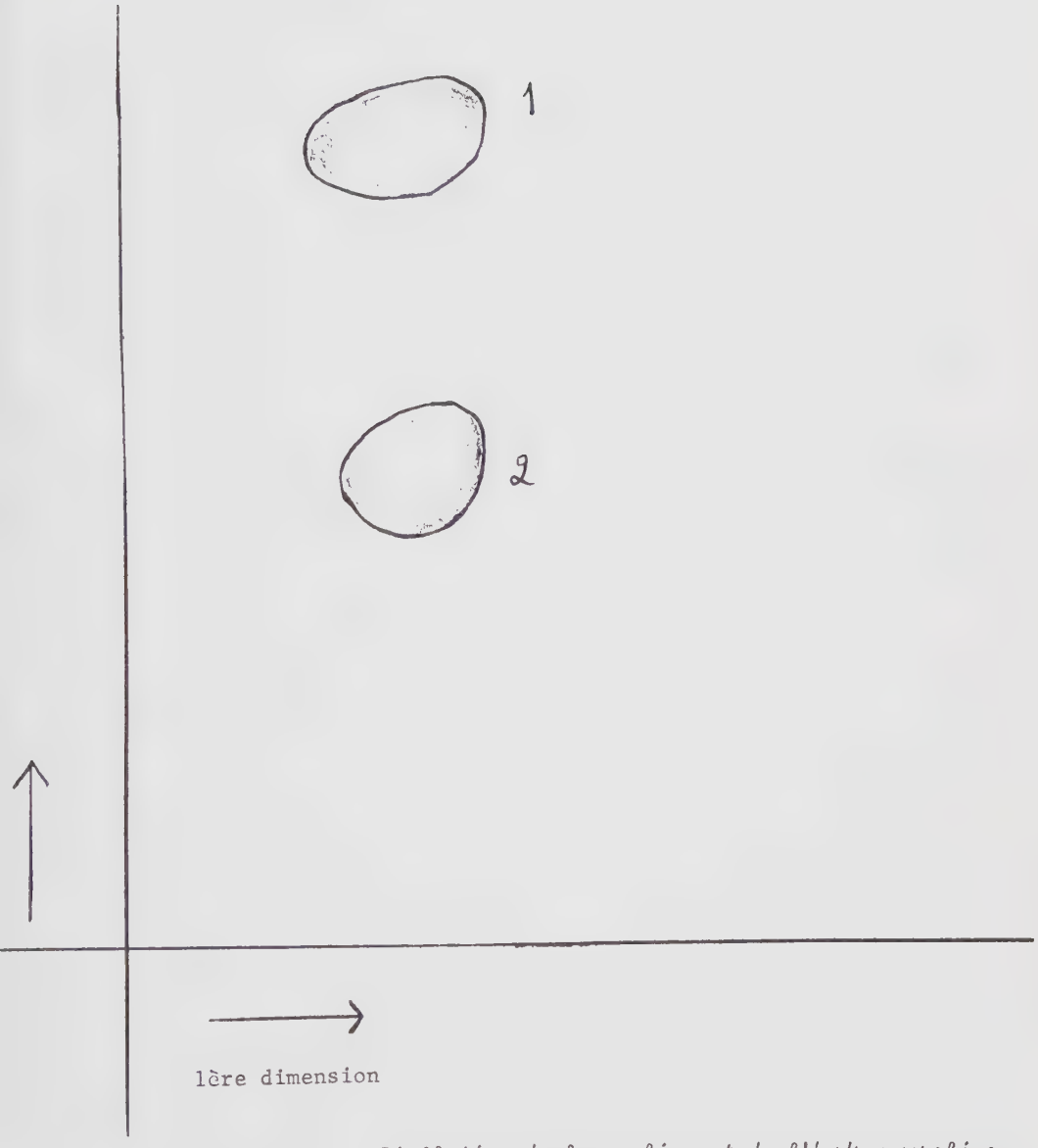


Figure 3 - Révélation de la proline et de l'hydroxyproline après chromatographie sur papier d'un extrait urinaire.

1 - Proline

Révélation par l'isatine (coloration bleue).

2 - Hydroxyproline

Révélation par le réactif d'Ehrlich (coloration rouge cerise).

B/ L' ELECTROPHORESE

Nous avons réalisé nos électrophorèses à pH 3,9, ce qui nous permet d'avoir, outre une vue d'ensemble des acides aminés neutres et basiques, une identification parfaite de certains acides aminés, très nettement visibles par cette technique ; c'est le cas en particulier de l'acide β amino-isobutyrique dont l'identification est difficile par la chromatographie .

Les électrophorèses sont réalisées sur papier Arches 304, sur bandes de 6 x 30 cm, dans un appareil en V renversé, type Durrum (2 migrations sur une même bande) (figure 4) .

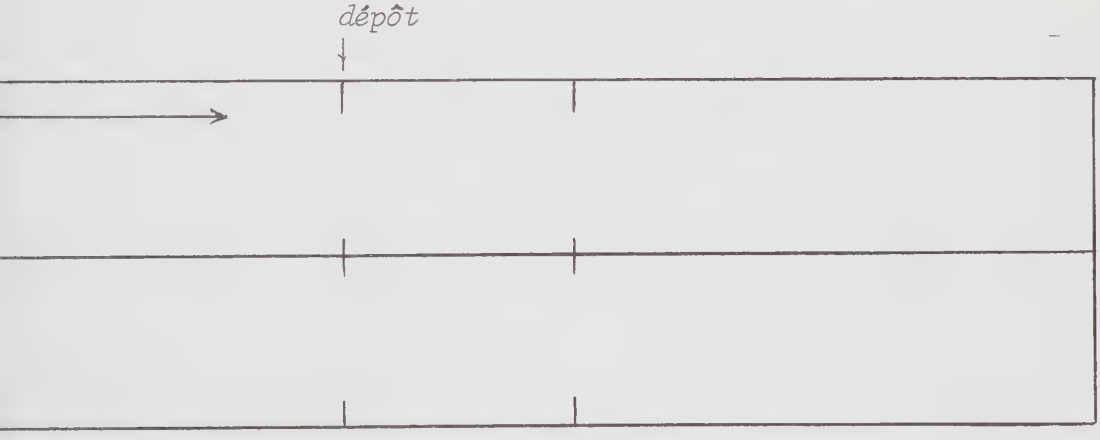


Figure 4

La solution tampon à pH 3,9 est celle proposée par MICHL (61) ; sa composition est la suivante :

- Pyridine ..... 30 ml
- Acide acétique ..... 100 ml
- Eau distillée q. s. p..... 5000 ml

La migration dure trois heures sous une tension de 240 volts . Après révélation par la ninhydrine , on obtient un électrophorégramme (figure 5) ; il est possible de "passer" les bandes à l'enregistreur . La courbe obtenue permet d'évaluer approximativement chaque groupe d'amino-acides (figure 6) .

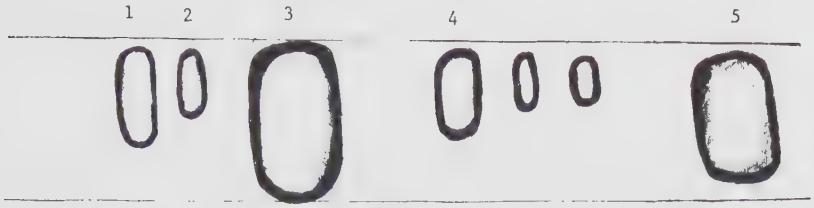


Figure 5 - Electrophorèse des acides aminés urinaires, à pH 3,9.
(révélation à la ninhydrine).

Figure 6 - Enregistrement de l'électrophorèse des acides aminés urinaires à pH 3,9.

1 - Acide glutamique.
2 - Acide α amino-adipique.
3 - Acides aminés neutres.
4 - Acide β amino-butyrique.
5 - Acides aminés basiques.

Cas particulier de la Cystine et de l'Homocystine

Ces deux acides aminés soufrés migrent à l'électrophorèse avec la fraction neutre . D'autre part, ils se trouvent sur le chromatogramme dans une zone chargée qui ne permet pas une identification très précise .

Dans le cas où l'urine présente une réaction de Brand positive (coloration rouge par action, sur l'urine alcalinisée par l'ammoniaque, d'une solution aqueuse de cyanure de sodium à 5 p. cent en présence d'une solution aqueuse de nitroprussiate de sodium à 5 p. cent), indiquant la présence d'acides aminés soufrés, tels que cystine ou homocystine, il est possible de les identifier après transformation en acides correspondants . Il suffit pour cela, après avoir déposé l'extrait urinaire sur la feuille de papier, de réaliser une péroxydation en déposant sur cet extrait une goutte d'eau oxygénée à 110 volumes . Celle-ci va rompre le pont disulfure de ces amino-acides et transformer respectivement la cystine et l'homocystine en acide cystéique et acide homocystéique .

Ces deux derniers migrent alors dans la zone des acides aminés acides, et sont donc nettement séparés et faciles à identifier . Il suffit de faire migrer simultanément des témoins de ces deux acides aminés qui permettront un repérage exact des fractions à reconnaître (figure 7) .

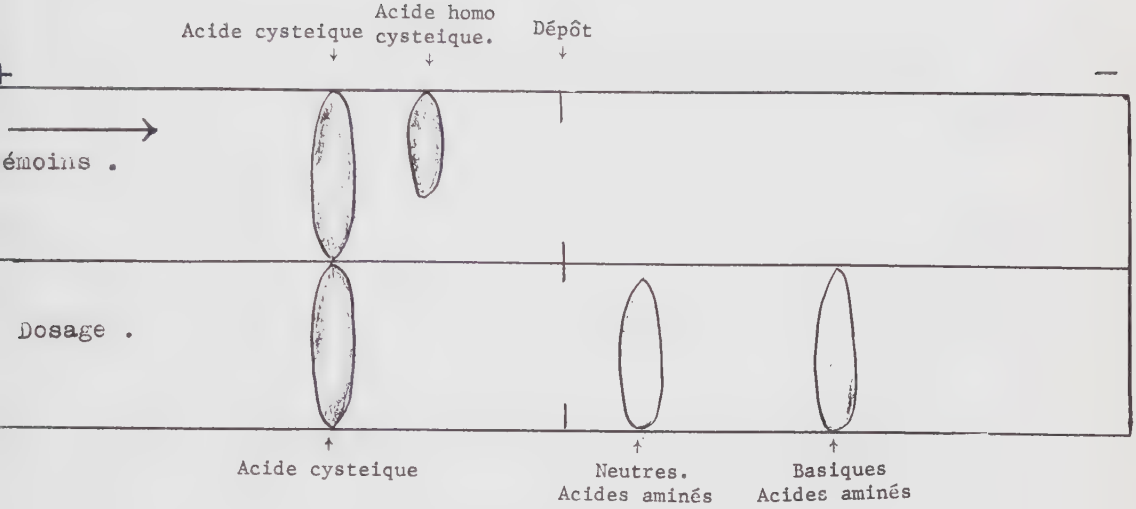


Figure 7 - Electrophorèse des acides aminés soufrés après oxydation.

CHAPITRE II

EXPLORATION FONCTIONNELLE DU METABOLISME DE L'HYDROXYPROLINE

A_/ RAPPEL METABOLIQUE

L'hydroxyproline est un aminoacide qui ne se rencontre pratiquement que dans une seule protéine, le collagène, et, à un degré moindre, dans l'élastine (STEIN) (85) . Sa distribution dans les protéines animales est par suite restreinte aux protéines du tissu conjonctif .

1°- Biosynthèse .

La biosynthèse de l'hydroxyproline, par hydroxylation de la proline, ne se produit nullement sur la proline libre mais seulement au cours de la biosynthèse du collagène, c'est-à-dire sur la chaîne polypeptidique elle-même (60) : par suite, l'exploration fonctionnelle du métabolisme de l'hydroxyproline permet de suivre le métabolisme du collagène et toute altération de ce dernier aura comme corollaire une modification de l'hydroxyprolinémie et de l'excrétion des métabolites de l'hydroxyproline dans l'urine .

Il y a en effet plus de 20 ans que STETTEN (86) a montré qu'après administration de proline marquée avec ^{15}N et du deutérium à des rats pendant trois jours, l'acide aminé le plus marqué était l'hydroxyproline. Cette importante observation, que la proline plus que

l'hydroxyproline était le précurseur de l'hydroxyproline du collagène, a été confirmée depuis par de très nombreuses expériences . Citons seulement les travaux récents de PROCKOP (73) qui a constaté que l'injection de proline marquée avec du ^{14}C à des embryons de poulets, entraînait une activité spécifique de l'hydroxyproline plus faible que celle de l'hydroxyproline unie dans une chaîne peptidique : ceci montre bien que l'hydroxyproline libre ne peut être une source appréciable de l'hydroxyproline du collagène . Des études plus récentes ont encore démontré que le lieu de synthèse du collagène était la fraction microsomiale, donc le mécanisme de synthèse du collagène serait tout à fait comparable à celui des autres protéines .

Nous pouvons conclure que les très nombreuses expériences réalisées grâce à des isotopes , sur la biosynthèse du collagène, tant in vitro qu'in vivo, montrent que l'hydroxyproline est purement endogène, qu'elle se forme ensuite par hydroxylation de la proline dans le collagène lui-même .

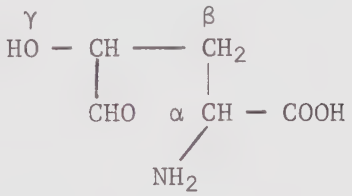
Cette hydroxylation dans la chaîne polypeptidique est sous la dépendance de plusieurs facteurs, en particulier l'acide ascorbique et vraisemblablement les hormones corticoïdes . La synthèse du collagène est en effet très sensiblement réduite dans les déficiences en acide ascorbique . Le rôle de cet acide n'est pas encore éclairci, mais il interviendrait dans l'hydroxylation de la proline et serait également nécessaire à la maturation des fibroblastes . L'hydroxylation de la proline est associée à l'incorporation d'oxygène atmosphérique . Le mécanisme serait comparable à celui de l'hydroxylation des composés aromatiques et des stéroïdes . Mais le système enzymatique serait différent de celui des autres hydroxylases connues .

2°- Dégradation .

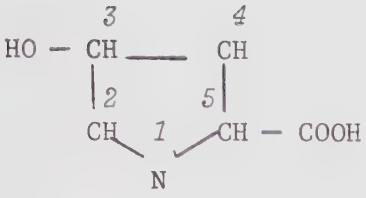
Après son introduction dans le collagène, une partie de l'hydroxyproline est catabolisée, tandis qu'une autre partie est éliminée par l'urine sans modification de structure .

On sait depuis longtemps que l'hydroxyproline est glucogénique : les travaux de STETTEN et SCHOENHEIMER (1944) (86) ont prouvé la conversion d'hydroxyproline en glutamate . Depuis des expériences réalisées par GIANETTO et BOUTHILLIER (25) avec l'hydroxyproline marquée sur son carbone 2 par du ^{14}C , ont confirmé cette voie métabolique : après administration d'hydroxyproline marquée à des rats, les aminoacides isolés des tissus et possédant la radio-activité la plus grande sont l'acide glutamique, puis l'acide aspartique .

Une oxydase (foie et rate) attaque l'hydroxy L - proline, l'oxyde et la transforme en γ semi-aldéhyde γ hydroxyglutamique .

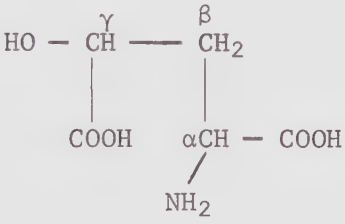


Ce composé est en équilibre avec le dérivé cyclique qui prédomine en solution .

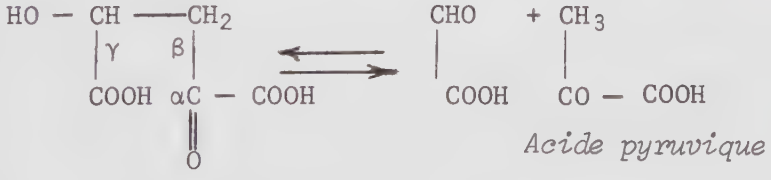


Acide Δ I pyrroline - 3 - hydroxy - 5 carboxylique.

Puis une déshydrogénase ayant pour coenzyme le N A D le transforme en acide γ hydroxyglutamique.



Par transamination, l'acide γ hydroxy-L-glutamique donne l'acide α céto γ hydroxy-glutarique qui est ensuite dégradé en acide glyoxylique et en acide pyruvique .

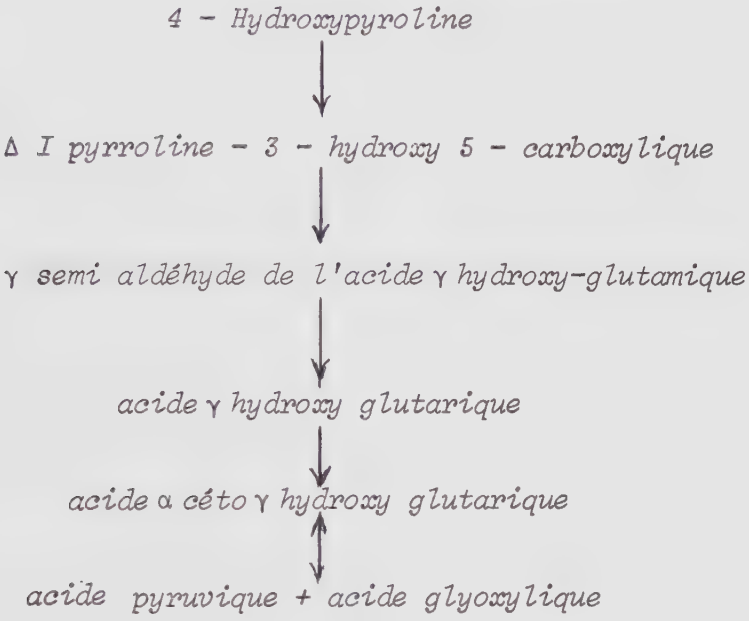


Acide pyruvique

Acide α céto γ hydroxy-glutarique

Acide glyoxylique

Nous pouvons résumer ce catabolisme dans le tableau suivant :


4 - Hydroxypyroline
Δ I pyrroline - 3 - hydroxy 5 - carboxylique
γ semi aldéhyde de l'acide γ hydroxy-glutamique
acide γ hydroxy glutarique
acide α céto γ hydroxy glutarique
acide pyruvique + acide glyoxylique

B_/ EXPLORATION FONCTIONNELLE

Une partie de l'hydroxyproline est éliminée dans les urines : le taux moyen d'élimination varie, suivant les auteurs de 20 à 40 mg par vingt-quatre heures pour l'hydroxyproline totale, mais il est pratiquement nul pour l'hydroxyproline libre (sauf chez le nourrisson et le prématuré) . Dans l'urine fraîchement émise, l'hydroxyproline est en effet essentiellement combinée sous forme de peptides (PLAQUET, BISERTE, BOULANGER (76)-) . Ces peptides provenant d'une hydrolyse incomplète des protéines du groupe des collagènes se cyclisent facilement pour donner naissance à des dicétopipérazines . Ces formes cyclisées se rencontrent chez l'enfant et en particulier dans les urines pathologiques (maladie de Wilson, maladie coeliaque, syndrome de Lowe, rachitisme). Elles ont été décrites également chez l'adulte, mais leur concentration est plus faible que chez l'enfant .

L'hydroxyprolinurie peut être considérée comme un témoin du métabolisme du collagène et l'on observe des taux plus élevés au cours de la croissance . L' étude des variations de l'hydroxyprolinémie est également intéressante, mais la concentration de l'hydroxyproline dans le sérum est très faible (7 à 10 µg par ml) et sa détermination est très délicate . On sait,depuis les travaux de KEYSER utilisant la méthode de dilution isotopique, que la majeure partie de l'hydroxyproline sérique est liée à des protéines .

Mettant en jeu l'électrophorèse sur colonne de cellulose acétolysée, FREY (21) a séparé les protéines sériques puis dosé l'hydroxyproline dans chacune des fractions ; il a ainsi montré que l'hydroxyproline était essentiellement localisée au niveau des α 2-globulines et de façon beaucoup moins constante au niveau de la sérum-albumine .

Il existe différentes techniques permettant le dosage de l'hydroxyproline dans le sérum et dans les urines . La plupart sont basées sur le même schéma réactionnel . Après hydrolyse acide de l'hydroxyproline conjuguée (pour doser l'hydroxyproline totale), on l'oxyde par un oxydant doux en acide pyrrol carboxylique-2 ou en pyrrole . L'oxydation est bloquée par addition d'un réducteur et après extraction par un solvant organique, l'acide pyrrol carboxylique-2 ou le pyrrole est dosé par colorimétrie du dérivé formé sous l'action du p-diméthyl-aminobenzaldéhyde en milieu acide et à chaud .

Le temps d'oxydation doit être soigneusement contrôlé ; il faut en effet éviter d'une part la polymérisation des dérivés pyrroliques qui diminuent l'intensité de la coloration, et, d'autre part, l'oxydation de diverses substances qui peuvent interférer en donnant naissance à des dérivés pyrroliques .

Nous avons essayé et étudié plusieurs méthodes (FILLIAT , COTTE et BRUNET (17), PROCKOP et SJOERDSMA (79), NEUMAN et LOGAN (67)-) modifiée par LEACH (52), pour nous arrêter à la technique de STEGMANN (84) que nous avons modifiée en plusieurs points .

Principe :

L'oxydant utilisé ici est la chloramine T. La réaction est stoppée par addition d'acide perchlorique puis la coloration est développée en présence de p-diméthylaminobenzaldéhyde à chaud .

Réactifs :

- HCl concentré
- Tampon acétate-citrate pH 6
  - . eau distillée ..... 500 ml
  - . acide citrique ..... 50 g
  - . acide acétique ..... 12 ml
  - . $CH_3COONa, 3H_2O$ ..... 120 g
  - . NaOH ..... 34 g

On mélange et on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée . Le réactif peut être conservé en présence de quelques gouttes de toluène .

- solution de chloramine T 0,05 M.
  . chloramine ..... 2,82 g
  . eau distillée ..... 40 ml
  . méthylglycol ..... 60 ml
  . tampon acétate-citrate pH 6 ..... 100 ml

- acide perchlorique 4 M.
  . acide perchlorique (Merck) à 60 p. 100 160 ml
  . eau distillée ..... 210 ml

- solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde
  . p-diméthylaminobenzaldéhyde ..... 20 g
  . méthylglycol ..... 200 ml

- solution standard de L-hydroxyproline à 1 g. par litre .

- NaOH 2 N

- Solution de SO_4Cu 0,05 M.

Mode opératoire :

1- Hydrolyse des urines .

Cette première opération n'a lieu que si l'on veut doser l'hydroxyproline totale .

Un échantillon des urines de vingt-quatre heures est placé dans une ampoule avec un égal volume d'acide chlorhydrique concentré . Après avoir scellé l'ampoule, celle-ci est laissée à l'étuve à 120°C pendant au moins trois heures . Nous prélevons alors 1 ml du mélange que l'on évapore à sec ; le résidu est alors repris par 5 ml d'HCl 0,001 N puis filtré .

Parallèlement, nous avons effectué une surcharge des urines en hydroxyproline en ajoutant à 0,5 ml d'urine, hydrolysée ou non, 0,5 ml d'une solution d'hydroxyproline à 1 g par litre . Après évaporation à sec, le résidu est repris par 5 ml d'HCl 0,001 N puis filtré .

2- Dosage :

Il est réalisé sur 1 ml du filtrat de l'urine hydrolysée pour le dosage de l'hydroxyproline totale, ou d'urine non hydrolysée pour le dosage de l'hydroxyproline libre , d'une part, et sur 1 ml du filtrat d'urine surchargée en hydroxyproline d'autre part . Dans chacun des tubes, 1 ml de NaOH 2N est ajouté , puis 0,2 ml d'une solution de sulfate de cuivre 0,05 M et, après agitation, 1 ml de la solution de chloramine T . Après une nouvelle agitation, les tubes sont abandonnés au repos pendant 20 minutes exactement .

Après addition de 2 ml d'acide perchlorique, puis de 1 ml de la solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde, les tubes sont portés au bain-marie à 60°C pendant quinze minutes . Il se développe une coloration rose dont l'intensité, après refroidissement, est évaluée au photomètre à 555 mμ .

Parallèlement, une gamme étalon est préparée en traitant la solution standard d'hydroxyproline dans les mêmes conditions .

Après évaporation de 1 ml de la solution standard, le résidu est repris par 5 ml HCl N/1000 . Cette solution , qui contient 1 mg d'hydroxyproline, soit 200 μg par ml, est répartie dans une série de tubes (voir tableau):

T U B E S	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*
olution d'hydroxyproline 200 µg (par ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
au distillée (ml)	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	1
uantité d'hydroxyproline n µ g	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200

Sur chacun des tubes, le dosage est réalisé suivant le protocole indiqué ci-dessus et l'on trace la courbe en portant les densités optiques en ordonnées et les taux d'hydroxyproline en abscisses.

C/ ETUDE CLINIQUE

L'hydroxyproline est un acide aminé particulièrement abondant dans le collagène, où il représente environ 14 p. 100 des acides aminés totaux .

Selon KLEIN (48) (49), le squelette renferme environ 50 p.100 du collagène total de l'organisme, aussi peut-on comprendre que l'appréciation des variations des métabolites du collagène soit susceptible d'apporter des renseignements sur le métabolisme de l'os .

Le collagène possède en effet une fonction architecturale au niveau de la matrice organique de l'os : il sert de support à la phase minérale phosphocalcique ; bien mieux, il intervient directement dans le phénomène de nucléation .

Plusieurs auteurs, après STETTEN (86) , signalent que l'hydroxyproline n'est pas directement incorporée dans la fibre du collagène, mais provient de l'hydroxylation de la proline, après que celle-ci ait été incluse dans des chaînes polypeptidiques .

De nombreux travaux sont venus récemment confirmer ces faits : PETERKOFSKY et coll. (73), GOTTLIEB et coll. (26), NEUBERGER et coll. (66) et GERBER (23) ont montré que le collagène du tissu osseux présente une activité métabolique plus élevée que celle du tissu conjonctif . De plus il est également démontré que, par suite de la résorption osseuse et de la destruction du collagène, l'hydroxyproline ainsi libérée sous forme de peptide ne peut être réutilisée par l'organisme . De ce fait, elle est soit métabolisée, soit éliminée dans les urines .

Selon SJOERDSMA et coll. (83), la fraction éliminée ne représente que 3 à 10 p. 100 de l'hydroxyproline ainsi libérée par destruction du collagène .

Il existe des rapports étroits entre cet acide aminé et le calcium qui entre dans la constitution de l'os; aussi les variations pathologiques les plus nettes s'observent-elles chez les rachitiques . Dans cette maladie, le signe biologique le plus constant et le plus révélateur est représenté par l'augmentation de l'élimination urinaire de l'hydroxyproline .

Nous avons étudié l'élimination de cet aminoacide chez vingt-deux enfants atteints d'affections pathologiques diverses; et c'est le résultat de cette étude que nous présentons ici .

Ces enfants se répartissent en deux groupes :

- Le premier groupe renferme les sujets atteints de rachitisme que nous avons subdivisé en :
  1 - rachitisme mineur
  2 - rachitisme commun moyen
  3 - rachitisme majeur .

- Le deuxième groupe est représenté par les encéphalopathies .

Nous avons d'abord étudié l'élimination de l'hydroxyproline urinaire chez des sujets normaux (tableau I), âgés de deux mois à un an . Sur ce tableau , nous constatons que les nourrissons éliminent l'hydroxyproline libre à des taux assez importants et d'autant plus importants que l'enfant est plus jeune . En principe , à l'âge de six mois, on ne constate plus d'élimination d'hydroxyproline libre chez les sujets sains ou témoins . C'est sous forme d'hydroxyproline combinée qu'on la trouve toujours, mais à un taux plus bas que chez les sujets malades .

TABLEAU I

ETUDE DE L'ELIMINATION URINAIRE
DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ 2 ENFANTS TEMOINS
DE 6 MOIS ET 12 MOIS

Age en mois	*Poids en kg*	*Acides aminés urinaires mg / kg / 24h*	*Calcémie en mg/l*	*Hydroxyproline mg/ 24 h.*	
				libre	*totale*
6	3,600	4	100	2	12
12	8	3,5	99	0	15

Les enfants atteints de rachitisme mineur, au nombre de 7, et dont l'âge varie de deux mois à treize mois, présentent des anomalies radiologiques, localisées à la région métaphysaire ; chez ces enfants, le poids est bien souvent inférieur à la normale (Tableau II) .

TABLEAU II

ETUDE DE L'ELIMINATION URINAIRE
DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ 7 RACHITIQUES MINEURS

Age en mois	*Poids en kg*	*Acides aminés urinaires mg/kg/24h*	*Calcémie en mg/l*	*Phospho-rémie en mg/l*	*Phospha-tase en U. King*	*Hydroxyproline mg / 24 h.*	
						libre	*Totale*
3	4,250	10,1	63	52	56	7	22
7	6	17,6	76	25	> 80	10	40
3	3,800	16,3	94	33	> 80	15	60
2	4	8,7	66	60	> 80	25	80
13	4,250	8,2	91	53	59	13	30
8	7,500	13,8	80	46	> 80	20	57
8	7	37,30	73	40	> 80	12	46

Chez les enfants atteints de rachitisme commun moyen, qui sont au nombre de 6, on observe les signes cliniques habituels du rachitisme classique (craniotabès, chapelet costal, nouures épiphysaires), et les signes radiologiques prédominent à la métaphyse des os longs . L'âge varie de trois mois à douze mois (Tableau III) .

TABLEAU III

ETUDE DE L'ELIMINATION URINAIRE DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ 6 MALADES ATTEINTS DE RACHITISME COMMUN MOYEN

Age en mois	*Poids en kg*	*Acides aminés urinaires mg/kg/24h*	*Calcémie en mg/l*	*Phospho-rémie en mg/l*	*Phospha-tase en U. King*	*Hydroxyproline mg/ 24 h.*	
						libre	*totale*
12	6,600	28	98	36	34	12	45
3	5	26,8	70	30	> 80	14	50
9	6,250	19,6	95	42	41	17	57
10	6,800	13,3	91	20	> 80	11	40
8	7	10	80	41	> 80	13	42
12	8,200	11,6	88	33	> 80	14	40

Les enfants atteints de rachitisme majeur, au nombre de 3, et dont l'âge varie de trois mois et demi à quinze mois, présentent des déformations des os longs, parfois des fractures multiples et l'on note presque toujours un aspect d'ostéomalacie majeure sur les clichés radiographiques (Tableau IV) .

TABLEAU IV

ETUDE DE L'ELIMINATION URINAIRE

DE L'HYDROXYPROLINE CHEZ 3 RACHITIQUES MAJEURS

Age en mois	*Poids en kg*	*Acides aminés urinaires mg/kg/24h*	*Calcémie en mg/l*	*Phospho-rémie en mg/l*	*Phospha-tase en U. King*	*Hydroxyproline mg/ 24 h.*	
						libre	*Totale*
15	7,880	2,4	83	21	> 80	15	60
7	5	21,6	57	44	> 80	20	65
4	4,500	16,6	70	50	> 80	12	60

Les signes biologiques se manifestent par un taux de calcium sérique toujours inférieur à la normale, et très souvent par une hyperaminoacidurie . L'activité phosphatasique alcaline du sérum est toujours très élevée. La chromatographie révèle une tache assez importante et anormale d'hydroxyproline, qui est toujours augmentée .

Tous ces cas se caractérisent par une guérison après un traitement plus ou moins long vitamino-calcique .

Le deuxième groupe rassemble les encéphalopathies qui sont au nombre de 3 . L'âge varie de quatre mois à dix-sept mois .

Ici la calciurie et la calcémie sont sensiblement normales ; l'amino-acidurie, voisine de la normale, peut présenter une légère augmentation, mais par chromatographie, on observe une tache anormale d'hydroxyproline .

TABLEAU V

ETUDE DE L'ELIMINATION URINAIRE

DE L'HYDROXYPROLINE DANS 3 CAS D'ENCEPHALOPATHIE

Age en mois	*Poids en kg*	*Acides aminés urinaires mg/kg/24h*	*Calcémie en mg/l*	*Phosphorémie en mg/l*	*Phosphatase en U. King*	*Hydroxyproline mg / 24 h.*	
						libre	*totale*
17	6,880	3,9	100	33	21	8	20
4	4,460	8	99	49	62	10	23
8	6,150	3,9	94	45	26	7	22

Nous avons comparé nos résultats avec ceux rapportés par divers auteurs : RAVENNI et coll. (80) trouvent des chiffres d'hydroxyproline libre qui sont de l'ordre de 0, 84 à 1, 38 mg par vingt-quatre heures dans la tranche d'âge de 2 à 4 ans, et de 0, 40 à 0, 80 mg par vingt-quatre heures de 11 à 20 ans . Ultérieurement, les chiffres diminuent progressivement à l'âge adulte .

JONES et coll. (45), étudiant l'élimination d'hydroxyproline totale chez 80 sujets dont l'âge moyen se se situe entre 5 et 49 ans, constatent une très nette augmentation de l'excrétion entre 12 et 15 ans, avec une chute immédiatement après la puberté (30 mg environ) alors que la valeur moyenne d'excrétion d'hydroxyproline totale chez les sujets normaux adultes est de 20 à 25 mg (MITOMA) (62) . Un fait important à souligner est la disparition de l'hydroxyproline libre dans les urines au-delà de l'âge de 6 mois : les enfants de plus d'un an ne doivent pratiquement plus éliminer d'hydroxyproline sous forme libre .

KLEIN (48) (49) précise que les conditions d'hyper- ou d'hypohydratation du sujet n'influencent en aucun cas l'élimination de l'hydroxyproline libre ou combinée . Cependant, le régime alimentaire est susceptible de modifier cette excrétion .

PROCKOP et SJOERDSMA (79) ont montré que l'ingestion d'hydroxyproline libre détermine une élévation de l'hydroxyprolinurie libre . Au contraire, l'ingestion de viande ou de gélatine détermine une élévation de l'hydroxyprolinurie totale .

Enfin l'élimination d'hydroxyproline libre ne représente que 3 p. cent environ de celle de l'hydroxyproline totale .

Conclusion du Chapitre II :

L'exploration fonctionnelle du métabolisme de l'hydroxyproline nous a amené à mettre au point une technique nouvelle d'évaluation de cet acide aminé dans les urines . Ces dosages sont particulièrement utiles , car les modifications du taux d'élimination urinaire constituent le signe le plus constant et souvent le plus précoce des perturbations du métabolisme calcique .

CHAPITRE III

EXPLORATION FONCTIONNELLE DES CARENCES EN ACIDE FOLIQUE : DOSAGE DE L'ACIDE FORMIMINO GLUTAMIQUE

L'acide formimino-glutamique (FIGLU), métabolite intermédiaire de la dégradation de l'histidine dans l'organisme, et précurseur de l'acide glutamique, a été découvert en 1951 par BAKERMAN dans les urines de rats carencés en acide folique. Cette découverte fut confirmée par SILVERMAN (82). La dégradation du FIGLU nécessite en effet la présence d'acide folique, coenzyme permettant ce catabolisme.

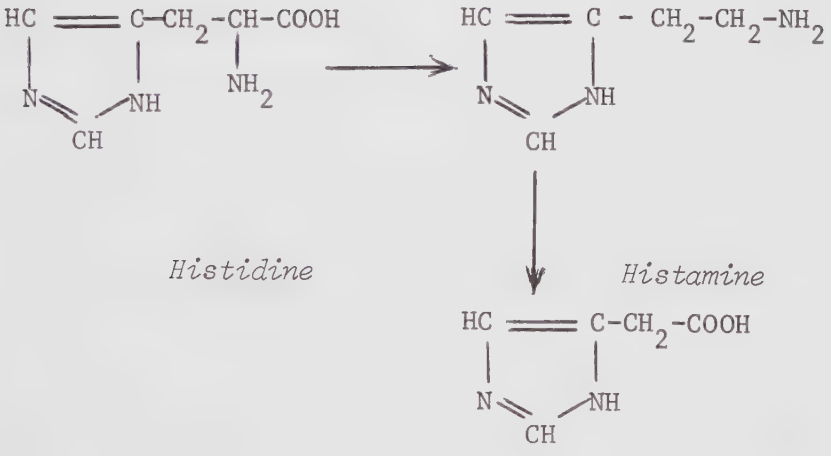
Le dosage du FIGLU après charge en histidine est à l'heure actuelle un dosage indirect, facilement praticable, de l'acide folique, ce qui explique les demandes de plus en plus nombreuses de ce dosage dans les services hospitaliers.

Après avoir rappelé brièvement le métabolisme ou plus exactement le catabolisme de l'histidine, nous décrirons la technique de dosage du FIGLU que nous utilisons et nous rapporterons quelques résultats obtenus chez des sujets carencés. Une expérimentation chez l'animal confirme les données précédentes.

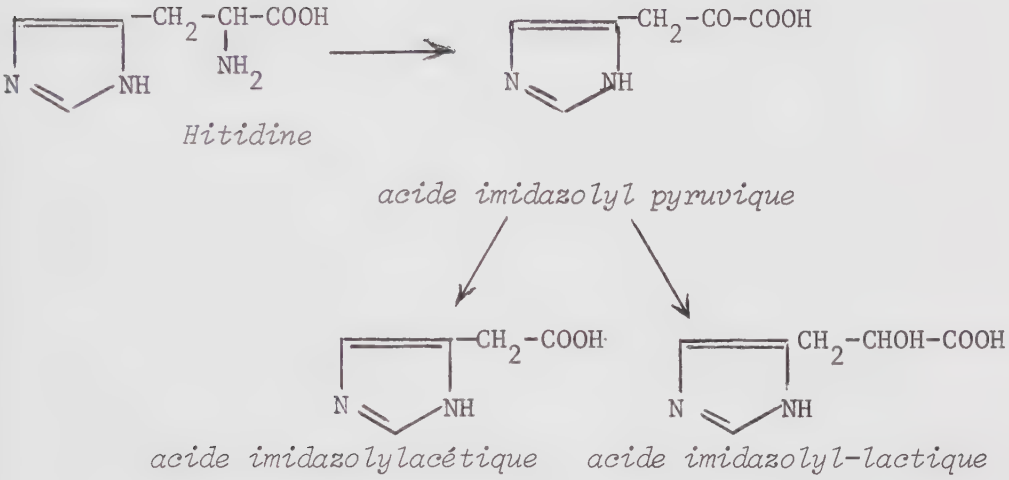
A_/ RAPPEL METABOLIQUE DE L'HISTIDINE

L'histidine, acide aminé indispensable chez l'enfant, peut être :

1°- décarboxylé en histamine : on retrouve dans l'urine de l'acide imidazolyl acétique .

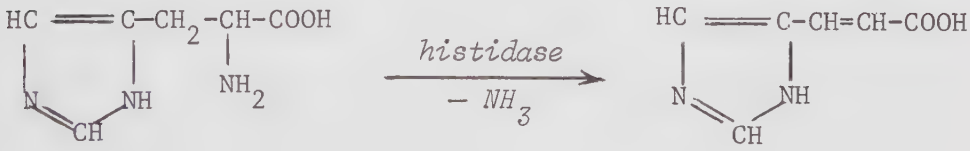


2° - désaminé en acide imidazolyl-pyruvique :



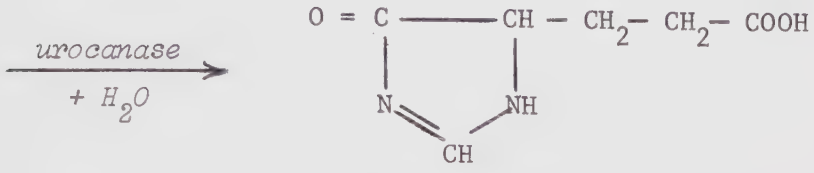
3° - transformé, et c'est la voie de beaucoup la plus importante sur le plan quantitatif, en acide glutamique.

L'histidine subit sous l'action de l'histidase, une désamination désaturante avec formation d'acide urocanique . Cette réaction est irréversible .



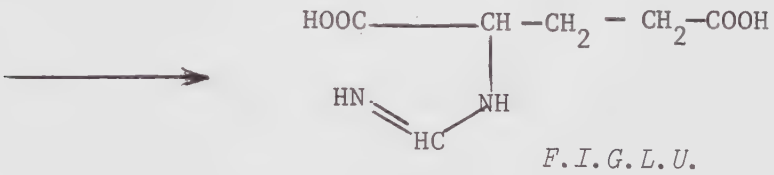
Histidine *Acide urocanique*

En présence de l'urocanase, l'acide urocanique est hydraté avec formation d'acide imidazolone-propionique .



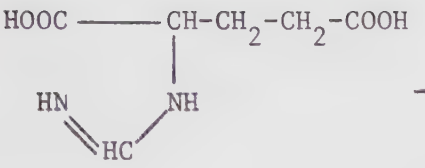
Acide imidazolone-propionique

L'imidazolone-hydrolase provoque l'ouverture du cycle imidazolone avec formation d'acide formimino-glutamique (FIGLU) .

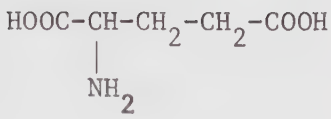


F.I.G.L.U.

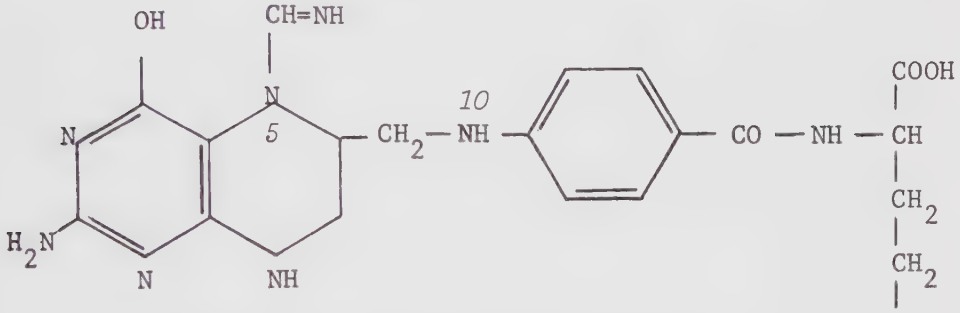
Sous l'influence de la formimino-glutamique-transférase, cet acide, par perte du groupement formimine qu'il cède à l'acide tétrahydrofolique, se transforme en acide glutamique . Par désamination puis oxydation l'acide formimino-tétrahydrofolique donne naissance à l'acide formyl-tétrahydrofolique .



Acide formiminoglutamique

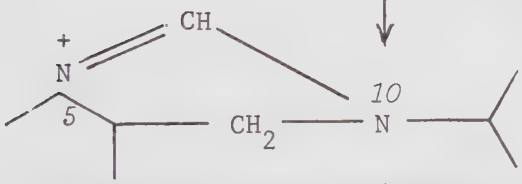


Acide glutamique



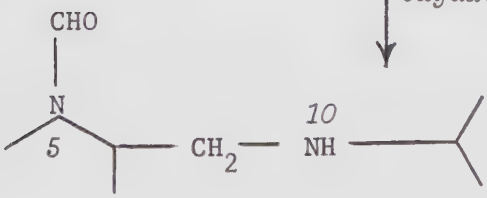
Acide N^5 formimino tétrahydrofolique

Cyclodéaminase



Acide N^5N^{10} méthényl tétrahydrofolique

Oxydation



Acide N^5 formyl-tétrahydrofolique

S'il y a carence en acide folique, on observe une accumulation d'acide formiminoglutamique par absence d'acide tétrahydrofolique . Cette augmentation sera mise en évidence d'une manière plus nette après épreuve de charge en histidine .

B_/ EXPLORATION FONCTIONNELLE

Les dosages de vitamines sont à l'heure actuelle en majorité des dosages microbiologiques basés sur la croissance d'une souche bactérienne . Dans le cas qui nous intéresse, il s'agit du Lactobacillus arabinosus, acide folique-dépendant (14) . Les difficultés et l'imprécision relative de ces techniques ont conduit les biologistes à pratiquer le dosage du FIGLU, produit chimique bien défini et qu'il est donc facile d'isoler et de doser .

Comme nous l'avons signalé plus haut on opèrera après charge orale en histidine qui révèlera la carence en acide folique .

1°- Protocole opératoire

On fait absorber au sujet à jeûn une quantité de chlorhydrate de L-histidine variable en fonction de l'âge:

- 3 g au-dessous de un an , 5 g entre 1 et 5 ans, 10 g entre 5 et 15 ans, 20 g chez l'adulte .

On recueille sur 2 ml d'acide chlorhydrique concentré les urines émises pendant douze heures après cette ingestion .

2°- Techniques de dosage du FIGLU .

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour effectuer le dosage de l'acide formiminoglutamique (14) .

a) Dosage enzymatique et spectrophotométrique (TABOR et WYNGARDEN) (87) .

Il est basé sur les réactions décrites plus haut et permettent la formation d'acide N^5N^{10} méthényl-tétrahydrofolique :

$$\text{F.I.G.L.U.} + \text{THF} \xrightarrow{\text{Figlu-transférase}} \text{acide glutamique} + \text{formimino T HF}$$

$$\text{Formimino THF} \xrightarrow{\text{cyclodéaminase}} N^5N^{10}\text{méthényl THF} + NH_3$$

Le N^5N^{10} méthényl THF présente une absorption dans le proche UV et on le dose en mesurant la densité optique à 365 nm. Cette technique nécessite évidemment des enzymes très purs et si ces réactifs sont maintenant disponibles, cette méthode est encore très peu utilisée .

b) Dosage colorimétrique (JOHSTONE, KEMP et HIBBARD) (44) .

L'urine est soumise à une hydrolyse acide (une heure à 37°C) . La coloration est obtenue à l'aide d'un réactif nitroprussiate-ferricyanure .

c) Dosage après séparation chromatographique ou électrophorétique .

C'est parmi ces techniques que nous avons fait notre choix et nous avons utilisé celle de ZALUSKY et HERBER (91) modifiée par ZALUSKY et coll. et décrite par FREZAL (22) . Ces auteurs réalisent l'électrophorèse sous une tension de 400 volts, mais comme nous ne possédions pas l'appareillage convenable, nous avons effectué la séparation électrophorétique à voltage normal (250 volts) . Cette technique se révèle être la plus accessible, car elle nécessite un matériel simple et des réactifs courants, et on n'utilise ni enzymes, ni étalon de Figlu .

Principe :

L'urine est soumise à une hydrolyse alcaline : le Figlu est alors transformé en acide glutamique. Après électrophorèse d'une partie aliquote de l'urine, on révèle les acides aminés par un réactif spécifique, la ninhydrine par exemple, et on pratique un dosage colorimétrique de la tache d'acide glutamique après élution .

Réactifs :

- KOH 2,5 N
- HCl 2,5 N
- Tampon à pH 3,9
  . pyridine ..... 30 ml
  . acide acétique ..... 100 ml
  . eau distillée q. s. p. .... 5 litres
- Solution de ninhydrine à 0,2 p. 100 dans l'alcool à 95 c
- Alcool éthylique à 70 c
- Solution étalon d'acide glutamique à 1 g par litre que l'on dilue au vingtième au moment de l'emploi . Cette solution contient 50µg par ml .

Mode opératoire :

Tubes à hémolyse	*1 Dosage*	*2 Témoin*
Urine (ml)	0,3	0,3
KOH 2,5 N (ml)	0,1	-
Eau distillée (ml)	-	0,2
Laisser 2 heures à la température du Laboratoire		
HCl 2,5 N (ml)	0,1	-

On dépose 50 µl d'urine hydrolysée au centre d'une bande d'électrophorèse (papier Whatman n°3) . On dépose à côté de cette urine hydrolysée d'une part 50 µl d'urine non traitée (pour doser l'acide glutamique préexistant), d'autre part un étalon d'acide glutamique (50 µl de la solution à 50 µg par ml) .

La migration est pratiquée pendant trois heures sous une tension de 220 volts, puis on sèche la bande de papier .

Sous l'effet du courant électrique en tampon pyridine-acide acétique, les aminoacides diacides (acide glutamique . .) migrent vers l'anode, les aminoacides dibasiques (lysine . .) vers la cathode, les autres aminoacides restent au point de départ (Figure 8) .

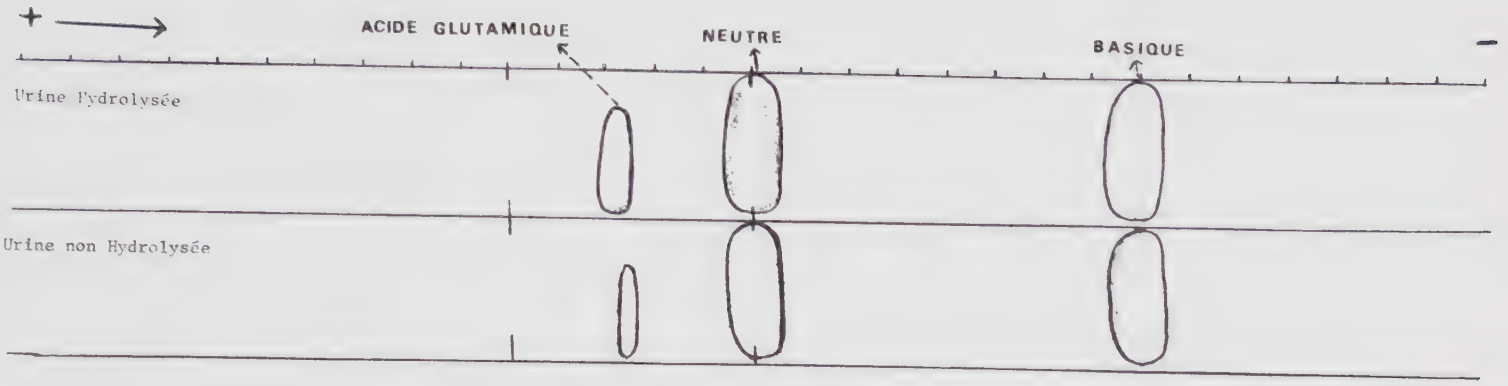
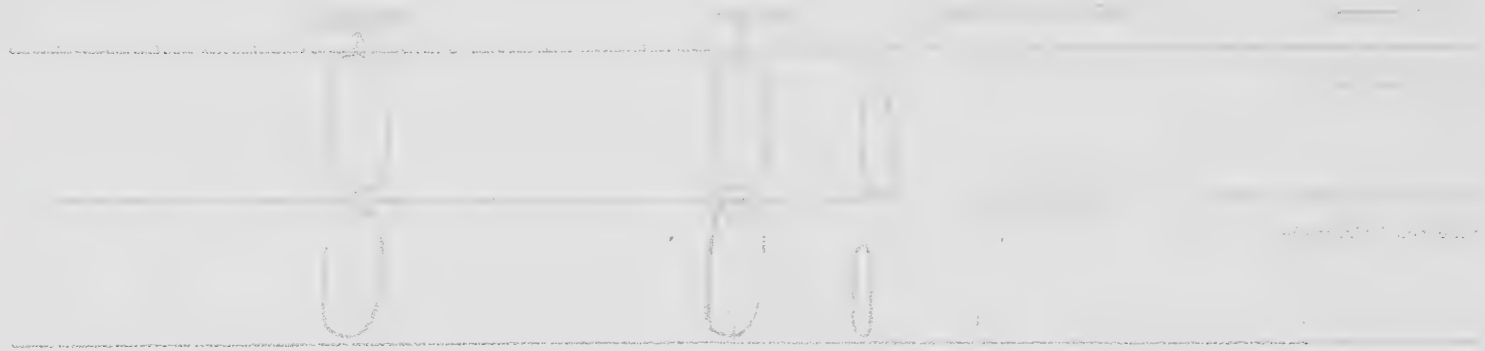


Figure 8 - Electrophorèse des acides aminés urinaires à pH 3,9
(après surcharge en Histidine).



Les aminoacides sont révélés par pulvérisation de la solution de ninhydrine suivie d'un séjour de dix minutes à l'étuve à 100°C .

L'enregistrement des taches (Titromatic Quéré) permet d'apprécier le taux d'acide glutamique libéré par hydrolyse du Figlu .

Il est possible de pratiquer ensuite un dosage colorimétrique après élution de la tache correspondant à l'acide glutamique, sur chacune des bandes . Cette élution est réalisée par agitation (15 minutes) des fragments de papier avec 1 ou 2 ml d'alcool à 70°C . Après centrifugation la lecture est faite au spectrophotomètre à 575 nm.

La différence des densités optiques de l' urine hydrolysée (D. O1) et de l'urine non traitée (D.O2) correspond à l'acide glutamique provenant de l'hydrolyse du Figlu .

La densité optique obtenue avec l'étalon d'acide glutamique (D. O étalon) correspondant à 2,5 µg de cet acide , on a :

$$\frac{2,5 \times (D.O\ 1 - D.O\ 2)}{D.O\ \text{étalon}} = \times \text{ µg d'acide glutamique dans la prise d'essai .}$$

Ce qui donne, en tenant compte de la dilution de l'urine au départ :

$$\frac{x \times 20000 \times 5}{3} \text{ µg/l ou } \frac{x \times 100}{3} \text{ mg/l}$$

Pour exprimer les résultats en Figlu, on multipliera ce chiffre par le rapport des poids moléculaires :

$$\left(\frac{x \times 100}{3}\right) \times \frac{175}{147} \quad x \times 40$$

C_/ ETUDE CLINIQUE

Chez les sujets normaux, le taux de Figlu est très faible (quelques mg par 24 heures) (55), même après absorption d'histidine . Dans les cas de déficience en acide folique, (en particulier au cours des malabsorptions, (81)), on observe une élimination supérieure à 100 mg.

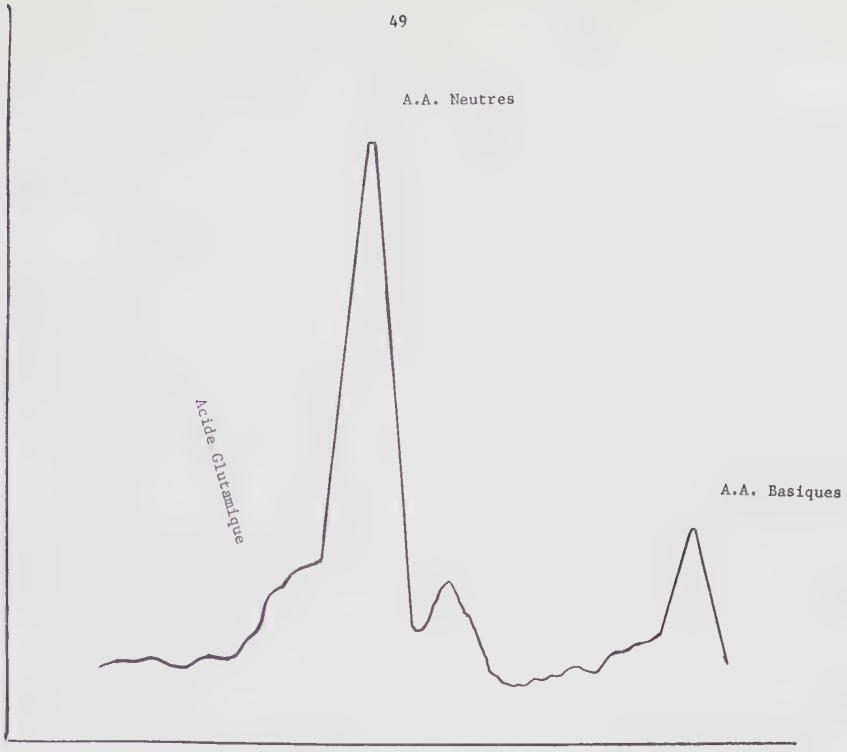
Les carences en acide folique peuvent avoir une origine alimentaire (alimentation insuffisante ou mal équilibrée), un défaut d'absorption intestinale que l'on peut rencontrer dans l'alcoolisme chronique, la maladie coeliaque, la stéatorrhée idiopathique, la sprue tropicale .

Une déficience en acide folique a été également constatée chez les femmes enceintes en fin de grossesse et une diminution notable de cet acide s'observe après administration d'antagonistes de l'acide folique ou d'antiépileptiques tels que les hydantoïnes .

Il est possible de noter une augmentation du FIGLU dans les hépatites, mais cette élévation est due alors à une déficience en Figlu-transférase .

Nous avons eu l'occasion d'effectuer un grand nombre de dosages de Figlu dont l'excrétion urinaire, après charge en histidine, s'est montré dans plusieurs cas fort importante . Nous montrons dans les courbes suivantes quelques-uns de ces exemples .

- courbe n° I : test à l'histidine chez un sujet normal figure 9
- courbes n°II, III et IV : test à l'histidine chez trois sujets carencés en acide folique .



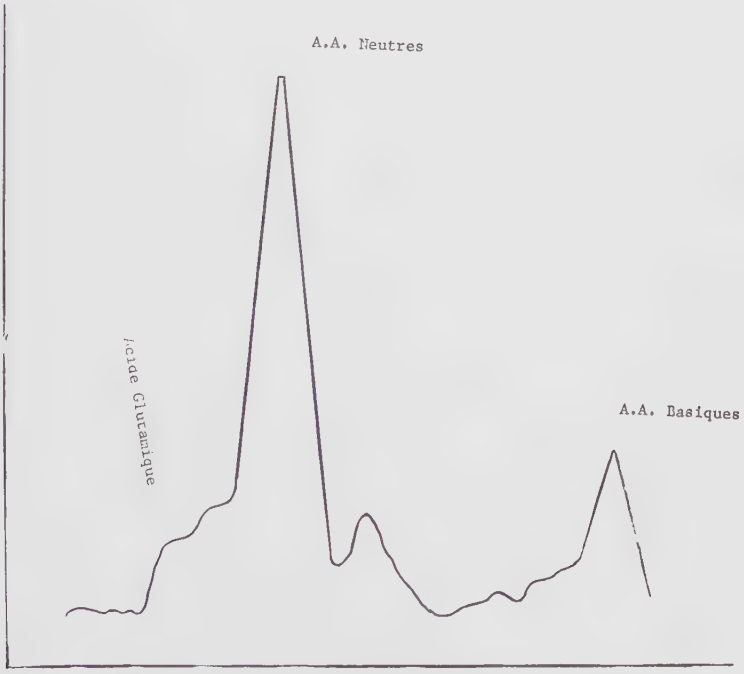
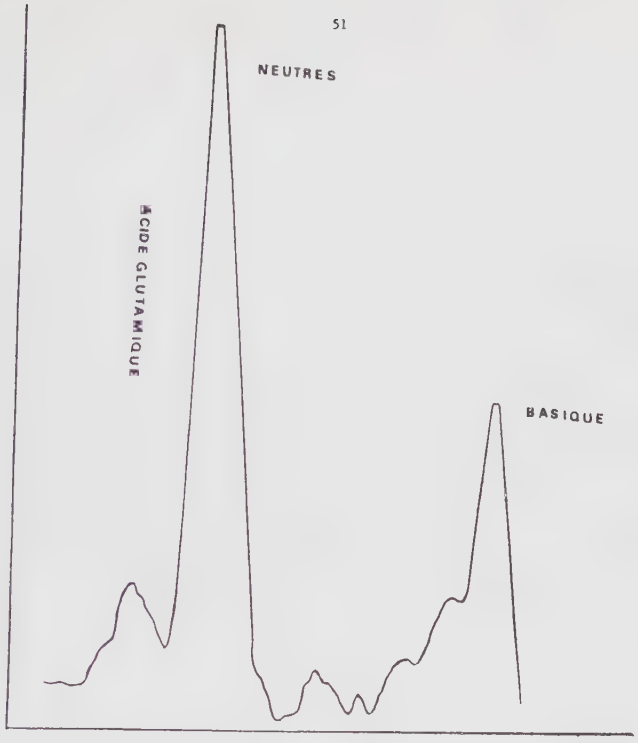


Figure 7 - Enregistrement de l'électrophorèse, à pH 3, des acides aminés de l'urine d'un sujet normal
Courbe 1 - urine non hydrolysée.
Courbe 2 - urine hydrolysée.

Le premier malade (A G) est un enfant de deux ans présentant une anémie mégaloblastique à la suite d'une absorption exclusive de lait de vache . Après surcharge en histidine (3g), l'électrophorèse des acides aminés urinaires à pH 3, 9 permet d'observer une augmentation très importante d'acide glutamique dans l'urine hydrolysée . L'enregistrement de l'électrophorégramme montre un pic très net correspondant à l'acide glutamique et le dosage , après élution, correspond à 70 mg de FIGLU par litre (figure 10 : courbes n°1 et 2) . Après administration de 3 comprimés de Foldine par jour pendant 32 jours, la carence en acide folique a disparu et le taux de FIGLU est devenu normal .



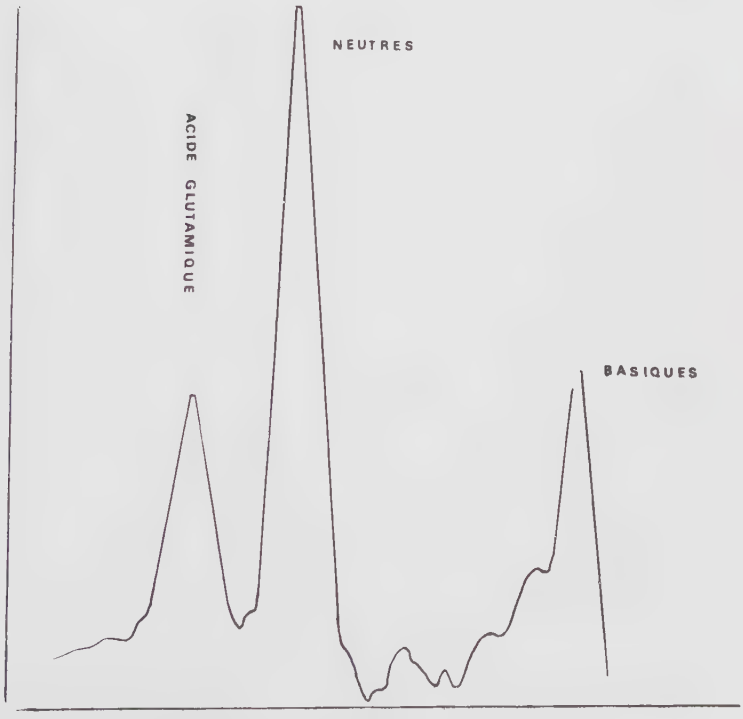


Figure 10 - Enregistrement de l'électrophorèse des acides aminés urinaires à pH 3,9

Courbe 1 - urine non hydrolysée.
Courbe 2 - urine hydrolysée.

Le deuxième malade (G A) est un enfant de six mois (P A. .) présentant une anémie mégaloblastique dite au lait de chèvre due à une carence en acide folique. Après surcharge en histidine (3g) on observe une élimination importante de FIGLU (340 mg. par litre)(figure 11). Après administration de Foldine, on observe au bout de 29 jours de traitement, la disparition des mégaloblastes et le test à l'histidine est devenu normal .

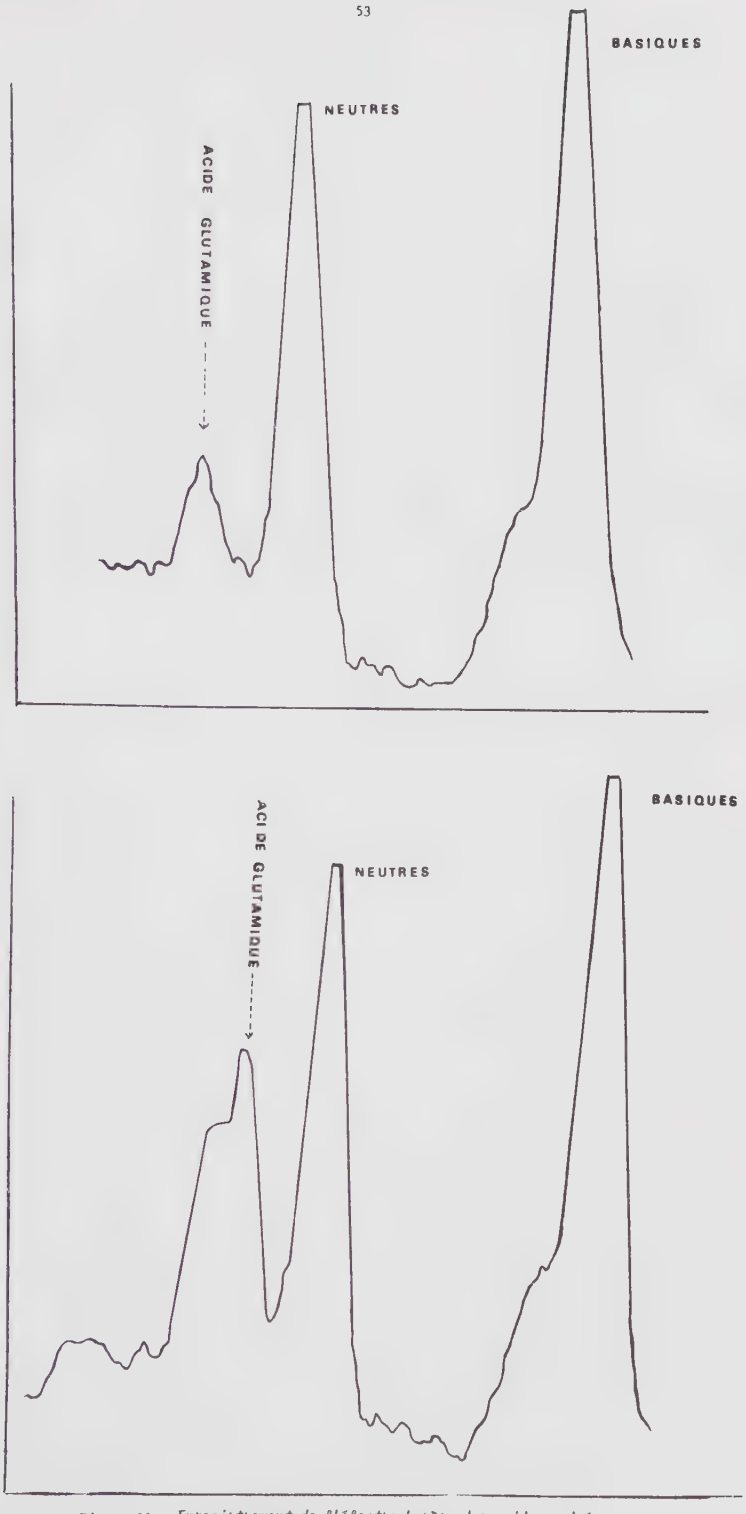
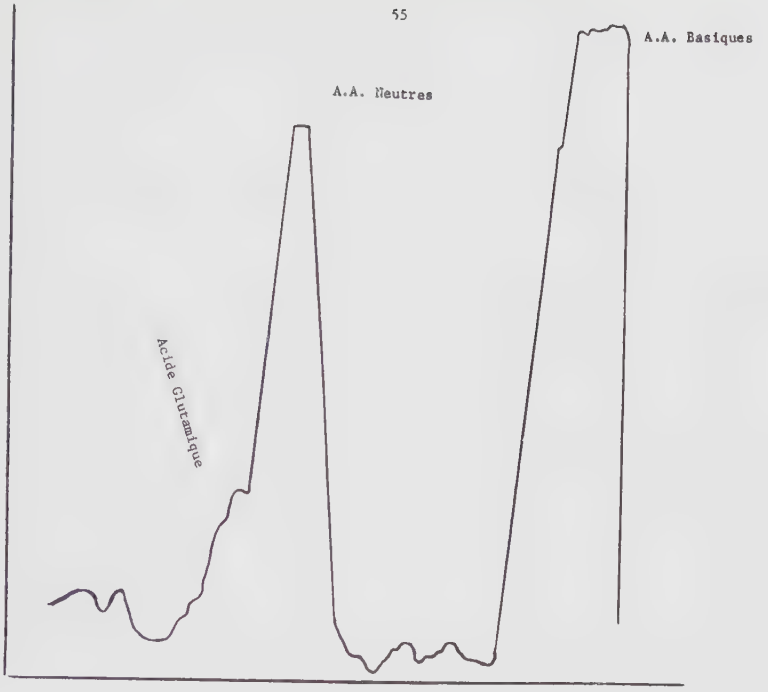


Figure 11 - Enregistrement de l'électrophorèse des acides aminés urinaires à pH 3,9

Courbe 1 - urine non hydrolysée,
Courbe 2 - urine hydrolysée.

Enfin la troisième observation que nous rapportons, concerne un adulte (M O) présentant également une anémie mégaloblastique due à une carence en acide folique . Le test à l'histidine a été nettement positif (figure 12) : en effet, l'administration de 20 g d'histidine a été suivie de l'élimination de 82 mg par litre de FIGLU .



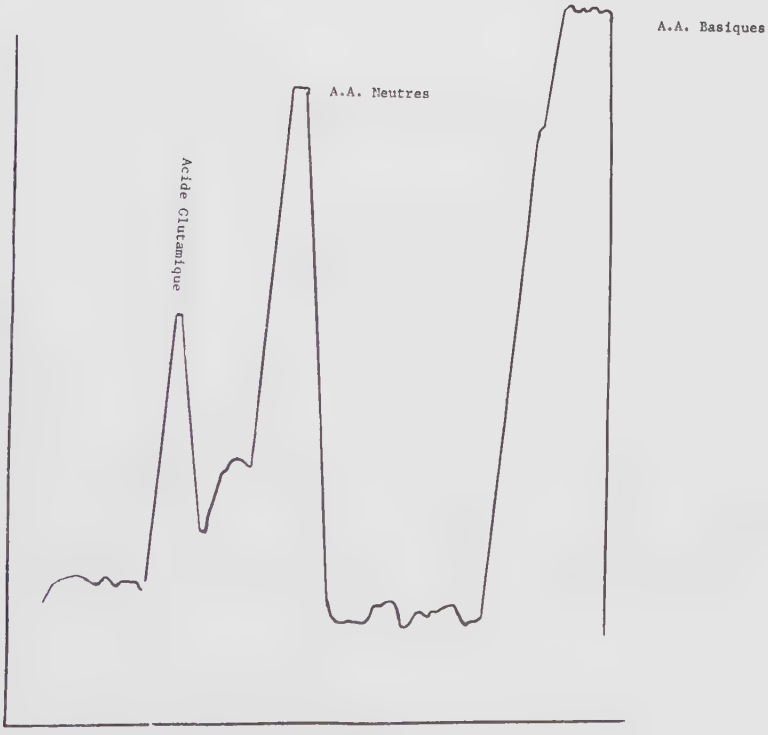


Figure 12 - *Enregistrement des acides aminés urinaires à pH 3,9.*
Courbe 1 - urine non hydrolysée.
Courbe 2 - urine hydrolysée.
sujet carencé en acide folique.

D_/ EXPERIMENTATION SUR LE LAPIN

Ce nouveau test, le test au FIGLU, est fort utilisé pour caractériser la carence en acide folique ; nous avons donc essayé de l'appliquer à l'animal . Nous avons choisi, comme animal d'expérience, le lapin . Pour provoquer la carence en acide folique chez l'animal, on dispose de nombreux procédés : l'un des plus simples et des plus utilisés consiste à rendre l'animal anémique . Dans ce but, nous avons saigné quotidiennement le lapin à la veine marginale de l'oreille, le prélèvement de sang étant de 30 à 35 ml de sang . Au bout d'une dizaine de saignées, le sérum était lactescent ; cette lactescence traduisant une chute du taux des protides et une augmentation des glycérides, nous avons supposé que cette modification de l'apparence du sang était accompagnée d'anémie et d'une carence en acide folique . Nous avons alors réalisé une première épreuve de surcharge en histidine .

Nous avons administré à l'animal qui pesait 4,500 kg, 2 g d'histidine . Cet acide aminé est très difficilement accepté par l'animal . Après de nombreuses tentatives infructueuses pour faire absorber des graines enrobées d'histidine, nous avons été contraints de dissoudre cet acide aminé dans l'eau chlorhydrique, au bain-marie bouillant (2 g d'histidine additionnés de 5 gouttes d' HCl concentré et de 5 ml d'eau distillée) . Puis à l'aide d'une sonde, nous avons fait pénétrer cette solution dans l'œsophage de l'animal . Nous avons ensuite recueilli les urines de douze heures sur 2 ml d'HCl concentré et nous avons dosé les acides aminés urinaires : l'élimination urinaire était de 10 mg par vingt-quatre heures et par kilo . En outre l'électrophorèse des acides aminés urinaires avant et après hydrolyse de l'urine était normale . L'animal n'était pas encore carencé en acide folique, le test au FIGLU était négatif .

Nous avons donc continué à effectuer des saignées quotidiennes . Six saignées supplémentaires ont été nécessaires pour carencer le lapin en acide folique .

Une nouvelle épreuve de charge en histidine fut alors réalisée et le test au FIGLU se révéla tout à fait positif . L'électrophorèse de l'urine du lapin avant et au cours de l'expérience permet de suivre l'évolution qui aboutit à la carence en acide folique (figures n°13, 14) . Le diagramme électrophorétique (figure 15) montre un pic très important d'acide glutamique après hydrolyse du FIGLU contenu dans l'urine .

L'expérimentation sur le lapin, reproduite sur plusieurs animaux, nous a donné des résultats comparables : l'apparition d'un trouble dans le sérum ne coïncide pas avec une carence en acide folique . La carence n'apparaît qu'après des saignées répétées et le test au FIGLU devient positif bien après que la lactescence du sérum soit apparue . Le test de surcharge à l'histidine s'est révélé tout à fait comparable chez l'homme et chez le lapin .

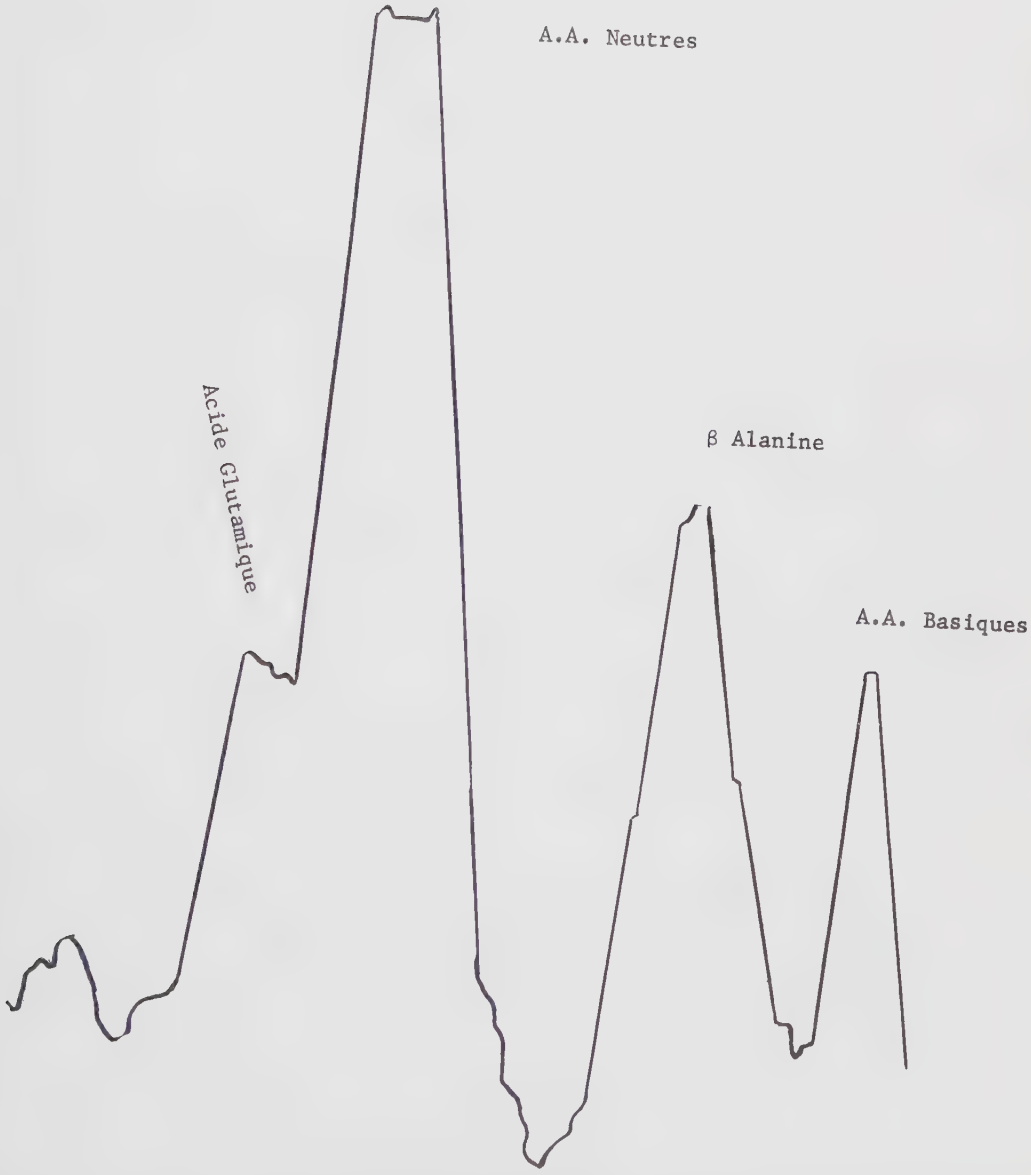


Figure 13 - Enregistrement de l'électrophorèse à pH 3,9 des acides aminés urinaires du lapin avant expérience

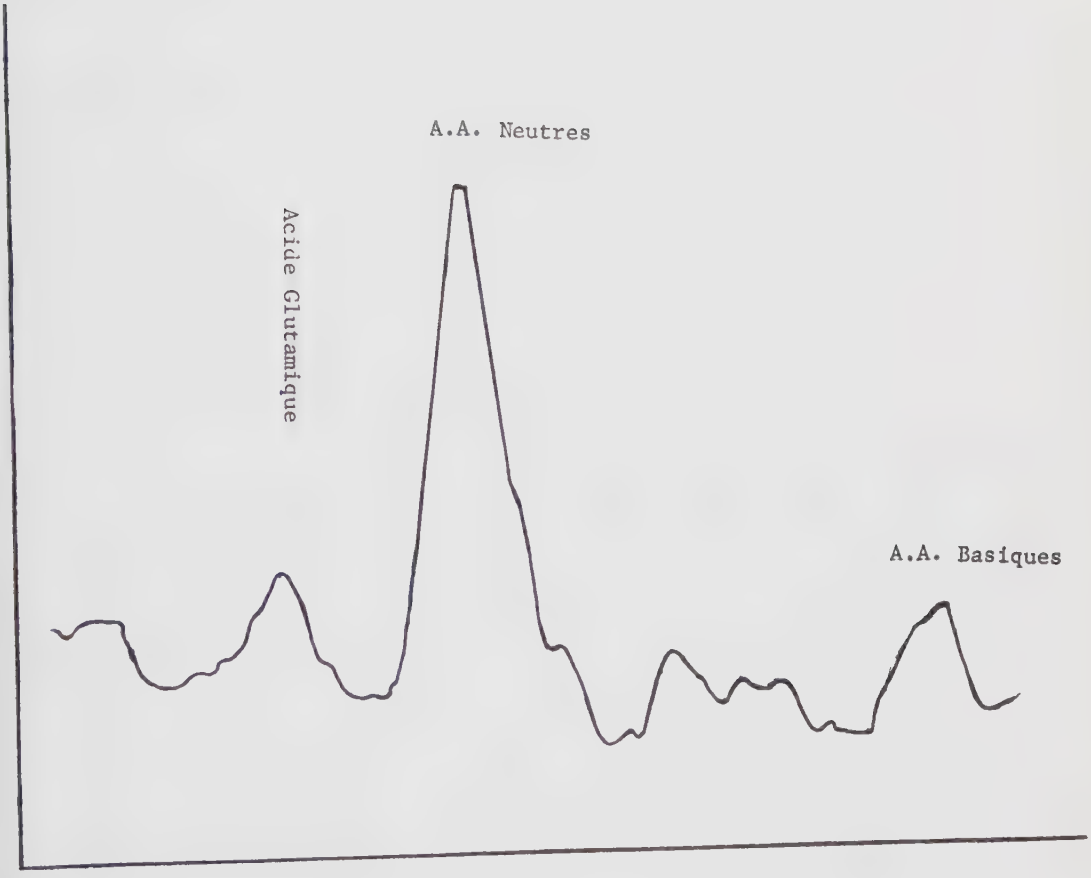
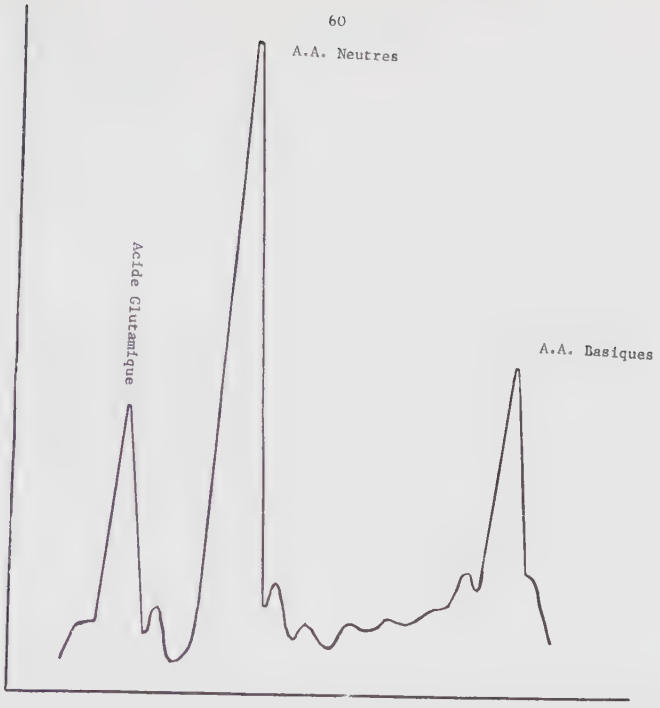


Figure 14 - Enregistrement de l'électrophorèse, à pH 3,9, des acides aminés de l'urine d'un Lapin, après dix jours de saignées.



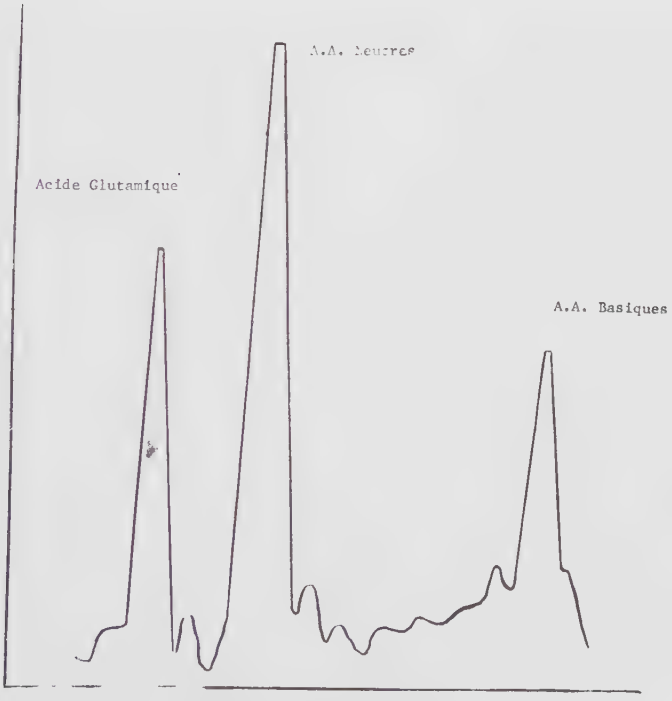


Figure 15 - Enregistrement de l'électrophorèse des acides aminés urinaires du lapin à pH 3,9

Courbe 1 - urine non hydrolysée.
Courbe 2 - urine hydrolysée.

CHAPITRE IV

EXPLORATION FONCTIONNELLE DE CERTAINS ASPECTS DU METABOLISME DU TRYPTOPHANNE

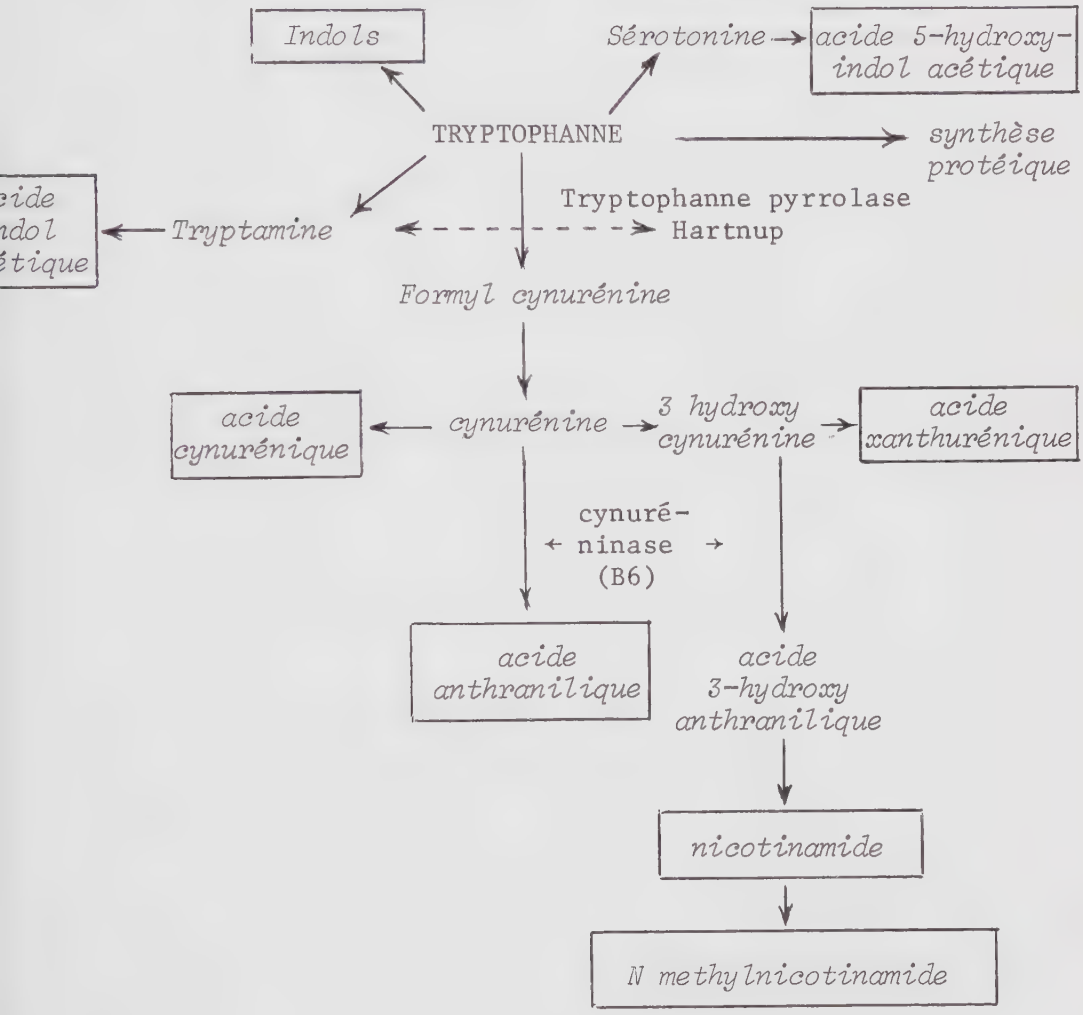
Le catabolisme du tryptophanne est complexe. Cet acide aminé possède de nombreuses voies métaboliques .

Si la majeure partie du tryptophanne d'origine alimentaire est utilisée pour la synthèse des protéines , une petite fraction est métabolisée selon la voie de la sérotonine (après hydroxylation en 5) . Une faible quantité est dégradée dans l'intestin par la flore intestinale et donne naissance à des dérivés indoliques . Comme tous les acides aminés, le tryptophanne est décarboxylé en amine, la tryptamine,éliminée dans les urines après action de la monoamine oxydase et transformation en acide indol acétique . Mais la voie principale de métabolisme est la voie de la cynurénine . Le tryptophanne subit dans une première étape l'action d'une tryptophanne pyrrolase, qui ouvre le cycle de l'indol et donne naissance à la formyl cynurénine . Puis il y a passage à la cynurénine qui aura trois destinées : une petite quantité est transaminée et cyclisée en dérivé quinoléique : l'acide cynurénique ; une grande quantité est hydroxylée en 3-hydroxycynurénine ; une fraction non négligeable subit une rupture de la chaîne latérale sous l'influence de la cynuréninase et conduit à l'acide anthranilique . Ce même enzyme catalyse la transformation comparable de la 3- hydroxy-cynurénine

en acide 3-hydroxyanthranilique, précurseur de la nicotinamide (vitamine PP) . Seule une petite quantité de 3-hydroxycynurénine échappe à l'action de la cynuréninase et subit une transamination suivie de cyclisation qui aboutit à la formation d'un dérivé quinoléique : l'acide xanthurénique, homologue hydroxylé de l'acide cynurénique .

Nous avons résumé dans un tableau les différentes voies du métabolisme du tryptophanne .

A_/ RAPPEL DU METABOLISME DU TRYPTOPHANNE



La riboflavine et surtout la vitamine B_6 jouent un rôle important dans le métabolisme du tryptophanne (HENDERSON) (33) .

Le phosphate de pyridoxal intervient comme coenzyme d'un certain nombre de réactions . Certains enzymes sont plus dépendants du pyridoxal de sorte que certaines voies sont plus touchées dans les déficits en vitamine B_6 . Quelle que soit l'origine de l'avitaminose B_6, son retentissement sur le métabolisme du tryptophanne est très net . Mais le système enzymatique le plus sensible est la cynuréninase qui assure le passage de la cynurénine et de la 3 hydroxy-cynurénine à l'acide anthranilique et à l'acide 3-hydroxy-anthranilique ; ainsi la plus grande partie du tryptophanne est catabolisée par les voies secondaires, en particulier celle des dérivés quinoléiques (acide cynurénique et surtout acide xanthurénique) .

B/ EXPLORATION FONCTIONNELLE

1°- Exploration statique .

Elle se résume en une étude des métabolites urinaires du tryptophanne (LEMONNIER (54)).

a) Chromatographie des métabolites de l'acide aminé .

La plupart des métabolites peuvent être séparés par chromatographie sur papier ou par chromatographie en couches minces(COTTE et coll. (11)).

On peut utiliser soit la technique de JEPSON (36), avec comme solvants isopropanol/ammoniaque/eau (200/10/20) en première dimension, et butanol/acide acétique/eau (120/30/50) en seconde dimension ; soit la technique de DALGLIESCH (12) dont les deux systèmes de solvant sont : butanol/acide acétique/eau (120/30/50) en première dimension et chlorure de potassium à 20 p.100 en seconde dimension . Sur ces chromatogrammes, deux

systèmes de révélation sont mis en œuvre : l'examen en lumière de Wood qui permet de localiser un certain nombre de composés de la voie de la cynurénine, et la coloration au réactif d'Ehrlich qui permet d'identifier les dérivés à noyau indolique (mais l'urée donne également une coloration) .

La chromatographie permet de révéler les anomalies qui se traduisent par une augmentation de certains métabolites (TOMPSETT (88) -) .

b) Dosages chimiques :

1- du 5 HIA = acide 5-hydroxy-indol-acétique, qui reflète le métabolisme de la sérotonine et dont le taux normal est de 4 à 8 mg par 24 heures .

2- dosage de l'indoxyl-sulfate, qui permet d'apprécier la voie des indols .

3- dosage de l'acide xanthurénique, métabolite principal de la voie de la cynurénine . La technique la plus classique est fondée sur la coloration verte que donne ce composé avec les sels ferreux en milieu bicarbonaté .
Le taux normal est inférieur à 10 mg par 24 heures .

La méthode que nous avons utilisée est la même que celle qui fut décrite par MUSAJO (65) . Dans cette réaction, une solution de bicarbonate de sodium et de sulfate ferreux ammoniacal préparée extemporanément (1 ml de CO_3NaH saturé et 0, 25 ml de solution de $(SO_4)\,2\,FeNH_4$ à 0, 5 p. 100) réagit sur l'urine : à 1 ml d'urine, on ajoute 1, 25 ml de solution de bicarbonate de soude -sulfate ferreux ammoniacal, puis 7 ml environ d'eau distillée, en présence de phénolphtaléine(si la solution n'est pas légèrement rose, on procède à l'addition de soude N, goutte à goutte, jusqu'à coloration rose) . Neutraliser ensuite avec de l'acide chlorhydrique 0, 1 N . On ramène à 10 ml avec de l'eau distillée . Après centrifugation, la lecture de la coloration est effectuée à 620 nm . Nous avons résumé dans un tableau les différentes étapes de cette réaction colorée .

	Blanc	*Dosage*	*Témoin urine*	*Standard*	*Témoins standard*
H2O	1 ml				
Urine		1 ml	1 ml		
Standard 1 mg °/°° dilué au 1/10				1 ml	1 ml
Solution CO3HNa saturée			1 ml		1 ml
Réactif de 0,5 de (SO4) 2 FeNH4 + 1 ml CO3HNa fraichement préparé.	1,25 ml	1,25 ml		1,25 ml	
Densité optique	Zéro	D	TU	S	TS

On calcule par la formule acide xanthurénique mg/ml

$$0{,}1 \times \frac{D - TU}{S - TS} = u$$

Résultat obtenu : multiplier par le volume des urines avant et après absorption du tryptophanne.

2°- Exploration dynamique .

Certains troubles du métabolisme peuvent n'exister qu'à l'état latent et ne peuvent être mis en évidence que par une surcharge en tryptophanne . Pour cette épreuve, on fait ingérer au sujet, à jeûn, du L Tryptophanne à la dose moyenne de 100 mg/kg avec, comme dose maxima chez l'adulte 5 g (Pham -HUU-TRUNG) (74) . Les dosages réalisés sur les urines de 24 heures entraînent chez le sujet normal, une augmentation d'acide xanthurénique qui n'excède pas 20 mg, une augmentation modérée de cynurénine et d'hydroxycynurénine .

Ce test de charge est essentiellement préconisé dans le dépistage des déficiences en vitamine B_6 .

C/ ETUDE CLINIQUE

1°- Déficit en vitamine B_6

La voie la plus perturbée est la voie de la cynurénine; la cynuréninase étant très étroitement dépendante du phosphate de pyridoxal, on observe une déviation vers la voie de l'acide xanthurénique .

L'épreuve de surcharge en tryptophanne est suivie d'une augmentation notable de l'élimination urinaire de l'acide xanthurénique et l'on admet que ce résultat est un témoin valable et suffisant de l'insuffisance en vitamine B_6 (JEUNE et coll.) (41) . Mais le déficit en pyridoxine entrave également, à un degré moindre cependant, la synthèse de la sérotonine, aussi l'élimination de son métabolite (5 HIA) est-elle diminuée après surcharge .

Cette épreuve de charge en tryptophanne est très utilisée pour déceler les carences induites par la thérapeutique, en particulier par le traitement prolongé à l'isoniazide . Cliniquement, les manifestations observées dans ces cas sont essentiellement polynévritiques . Sur le

plan biochimique, l'isoniazide forme avec la vitamine B_6 une hydrazone, ce qui entraîne une augmentation de l'élimination de la vitamine B_6 par l'urine (BIEHL et VILTER) (7) .

2°- Mongolisme

JEROME, LEJEUNE et TURPIN (38) ont étudié les troubles du métabolisme du tryptophanne au cours du mongolisme . Il y aurait, d'après l'étude de l'élimination des métabolites, une diminution de la voie de la sérotonine qui se traduit par une diminution d'excrétion du 5 HIA et, au contraire, une augmentation de la voie de la cynurénine et de la 3-hydroxycynurénine ; mais, dans cette voie de la cynurénine, il y aurait un déficit ou tout au moins une anomalie de l'hydroxycynurénine - transaminase, qui se traduit par un blocage du passage à l'acide xanthurénique dont l'élimination est très diminuée (O'BRIEN) (68) .

3°- Maladie de Hartnup

Le malade associe des éruptions à des troubles nerveux et psychiques (BARON et coll.) (2) et JOB (43) . La lésion est de type pellagroïde, prédominant sur les parties découvertes (il y a une photosensibilité très nette) . Les signes nerveux sont plus rares, il s'agit surtout d'une ataxie cérébelleuse . Il n'y a pas de retard mental ou alors il est très modéré et tardif . L'évolution est généralement bénigne .

Pathogénie :

Il s'agit d'un trouble de l'absorption du tryptophanne et de la plupart des acides aminés neutres au niveau de la muqueuse intestinale et du tubule rénal . Il en résulte une stagnation, dans l'intestin, du tryptophanne qui est dégradé surtout en indol (ASATOOR et coll.) (1) . Or , l'augmentation du taux de l'indol entraîne une diminution

de l'activité de la tryptophanne pyrrolase et par suite, une diminution de la synthèse de la nicotinamide . Or la vitamine PP est indispensable à l'absorption intestinale du tryptophanne . Il en résulte d'une part, une hyperaminoacidurie portant essentiellement sur les acides aminés neutres, d'autre part une excrétion urinaire accrue de dérivés indoliques (tryptophanne, acide indol acétique , acide indol lactique, indolyl acétyl glutamine) et une diminution d'excrétion de N méthyl-nicotinamide .

Dans le sang, le taux des acides aminés est légèrement diminué, surtout celui du tryptophanne .

La pathogénie des différents symptômes fait appel à l'insuffisance en vitamine PP .

Nous n'avons étudié, pour notre part, que des troubles du métabolisme du tryptophanne observés chez des mongoliens, et chez des sujets carencés en vitamine B_6 .

Le trouble de métabolisme du tryptophanne par carence en vitamine B_6 fut découvert pour la première fois par GYORGYI en 1934 . On a vu, dans le métabolisme du tryptophanne, que la voie principale de dégradation passant par la cynurénine et l'hydroxycynurénine nécessite la présence de phosphate de pyridoxal comme coenzyme pour aboutir à l'acide anthranilique et à l'acide 3-hydroxyanthranilique, puis à l'acide nicotinique ; quand il y a carence en vitamine B_6, la voie principale est bloquée ; il se produit alors une augmentation de l'acide xanthurénique ; la carence de vitamine B_6 chez l'animal détermine une anémie et des troubles de la croissance. On observe également des convulsions, tandis qu'il y a excrétion exagérée de l'acide xanthurénique dans les urines .

La carence en vitamine B_6 fut décrite par GREENBERG (27) en 1949, et cet auteur a travaillé sur les animaux et sur l'homme ; les animaux qu'il a choisis sont le rat, la souris, le chien et le singe . LEPKOWSKY et coll. (56) avaient déjà signalé le rôle de l'acide xanthurénique dans les carences en pyridoxal chez le rat. Le dosage de l'acide xanthurénique montre qu'il y a une augmentation d'excrétion d'acide xanthurénique dans les urines.

De même MCCOY et coll. (58) ont déterminé une carence en vitamine B_6 : par administration de façon prolongée d'un antagoniste de la pyridoxine (désoxypyridoxine); après une surcharge en tryptophanne , on note une augmentation de l'excrétion de l'acide xanthurénique dans l'urine . JUN-BI-TU (M. D.) et ZELLWEGER (47) ont également montré par administration d'un autre antagoniste de la pyridoxine, la DL Pénicillamine, qu'il y avait une diminution de la sérotonine et une augmentation de l'excrétion de l'acide xanthurénique dans l'urine . En outre, on peut également observer une carence en vitamine B_6 au cours du traitement prolongé par l'isoniazide et ses dérivés .

Chez les nourrissons qui sont nourris avec du lait artificiel, on a noté des signes de carence en pyridoxal et cette carence se traduit par des convulsions . BESSEY et ses coll. (6) ont fait, sur ces malades, l'épreuve de charge en tryptophanne; ils ont observé une augmentation anormale de l'acide xanthurénique et l'état convulsif a disparu par l'administration de vitamine B_6 (addition au régime alimentaire de 0, 2 mg par jour de vitamine B_6). En outre les convulsions survenant au cours de toute carence sont sensibles à l'administration de vitamine B_6 (HENNEQUET) (34) . Ces convulsions dites pyridoxine-dépendantes du nouveau-né, qui ont été étudiées pour la première fois en France par JULIEN MARIE et ses coll. (46) et à l'étranger par BESSEY et ses coll. (6) se manifestent dès les premières heures de la vie .

Nous avons étudié plusieurs malades présentant une insuffisance en vitamine B_6 . Chez chacun d'eux, l'épreuve de surcharge en tryptophanne s'accompagnait d'une augmentation très importante d'acide xanthurénique dans les urines . Un des cas les plus typiques est celui d'un enfant malade qui présentait en outre une phénylcétonurie . Nous le reportons en détail : le dosage d' acide xanthurénique avant surcharge donne comme résultat 0, 378 mg dans les urines recueillies pendant 6 heures , avant l'épreuve . Après surcharge, le taux d'acide xanthurénique est de 2, 38 mg dans le premier échantillon (6 premières heures) , 4, 20 mg dans le deuxième échantillon (6h - 12h), 2, 32 mg dans le troisième échantillon (12h-18h) .

Un deuxième cas remarquable était représenté par un malade déjà carencé en acide folique . Les urines de 24 heures, avant surcharge contiennent 22 mg d'acide xanthurénique . Après l'épreuve dynamique de surcharge en tryptophanne, cet acide atteint le taux de 42 mg dans les urines de 24 heures . Cette augmentation considérable permet d'affirmer la carence en vitamine B_6 .

Pour identifier et évaluer rapidement l'acide xanthurénique éliminé dans les urines, nous avons effectué une chromatographie selon la technique de Dalgliesch (12) en utilisant une solution témoin d'acide xanthurénique . L'emplacement du métabolite du tryptophanne était localisé par examen en lumière ultra-violette . Nous reportons sur les figures (16-17-18) les chromatographies de l'urine du malade carencé en vitamine B_6 avant et après épreuve de charge en tryptophanne . A défaut d'un dosage d'acide xanthurénique, il est donc possible par une chromatographie, de mettre en évidence la présence d'excès de cet acide dans les urines après surcharge en tryptophanne .

Nous avons également étudié les perturbations du métabolisme du tryptophanne chez un mongolien . Il s'agit d'un enfant âgé de 6 mois . Dans ses urines de 24 heures, nous avons trouvé 2 mg d'acide xanthurénique (donc on observe déjà une nette diminution de l'élimination urinaire de cet acide) . Après surcharge en tryptophanne (administration de 540 mg de L-tryptophanne), le taux d'acide xanthurénique est extrêmement bas, inférieur à 1 mg. Les dosages du métabolite de la sérotonine (acide 5-hydroxy-indol-acétique) montrent des modifications comparables : avant l'épreuve de surcharge, le dosage révèle une nette diminution de l'élimination urinaire du 5 HIA (1, 20 mg par 24 heures au lieu de 4 mg environ chez les sujets normaux) et après épreuve au tryptophanne, on trouve une élimination de 0, 7 mg par 24 heures . Donc le cas que nous présentons entre tout à fait dans le cadre des perturbations décrites par JEROME (38) et ses collaborateurs .

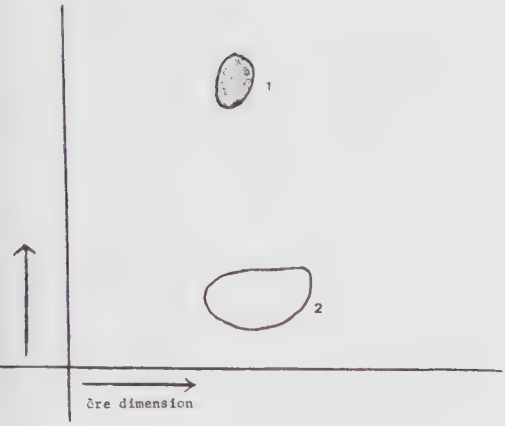


Figure 16 - Chromatographie de l'urine du malade avant l'épreuve de charge en Tryptophanne, révélation en lumière ultra-violette.

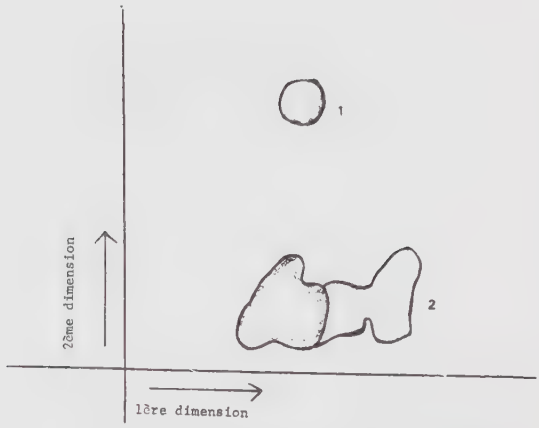


Figure 17 - Chromatographie de l'urine du malade avant l'épreuve de charge en Tryptophanne, additionnée d'une solution d'acide xanthurénique.

Figure 18 - Chromatographie de l'urine du malade après l'épreuve de charge en Tryptophanne.

1 - Tryptophanne

2 - Acide xanthurénique.

CHAPITRE V

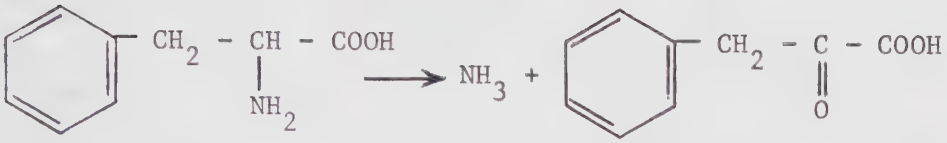
EXPLORATION FONCTIONNELLE DES PERTURBATIONS DU METABOLISME DE LA PHENYLALANINE

A/ RAPPEL METABOLIQUE

Cet acide aminé indispensable a deux voies essentielles de métabolisme . L'une accessoire, qui donne naissance à l'acide phényl-pyruvique (et l'acide phényl-lactique), l'autre primordiale, qui engendre la tyrosine. De plus, comme tous les acides aminés, la phénylalanine subit une décarboxylation qui donne naissance à l'amine correspondante (phényl-éthyl-amine) .

1°- Voie de l'acide phénylpyruvique.

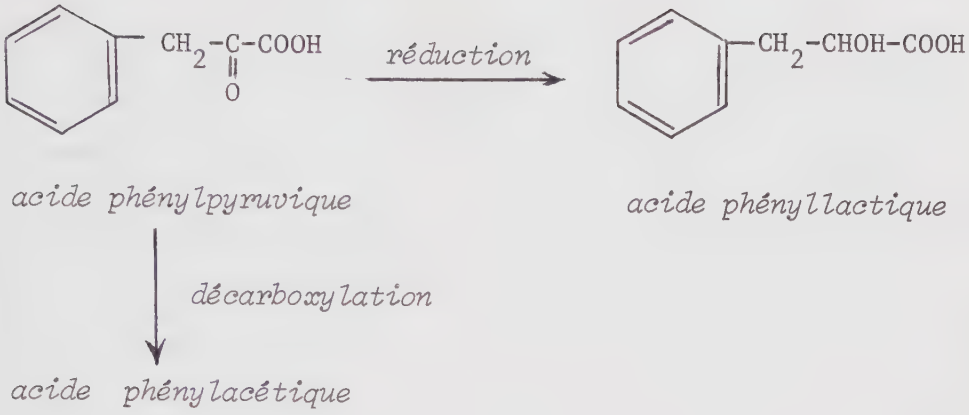
La phénylalanine subit une transamination en présence d'un acide α cétonique accepteur et perd un groupement NH_3 : cette réaction est catalysée par une transaminase dont le coenzyme est le phosphate de pyridoxal . La phénylalanine donne alors naissance à l'acide phényl-pyruvique .

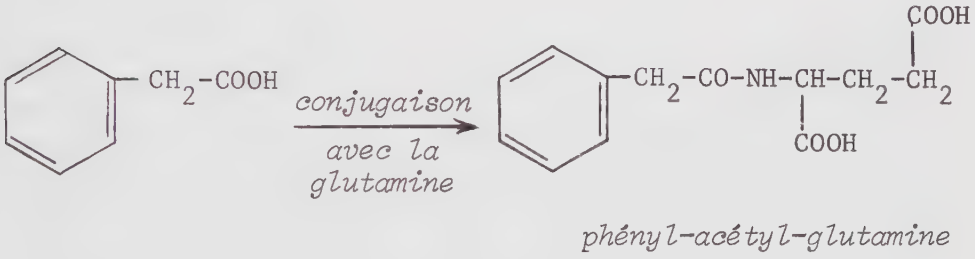


phénylalanine *acide phénylpyruvique*

Cet acide α cétonique peut également être formé par désamination oxydative de l'acide aminé aromatique correspondant, la phénylalanine .

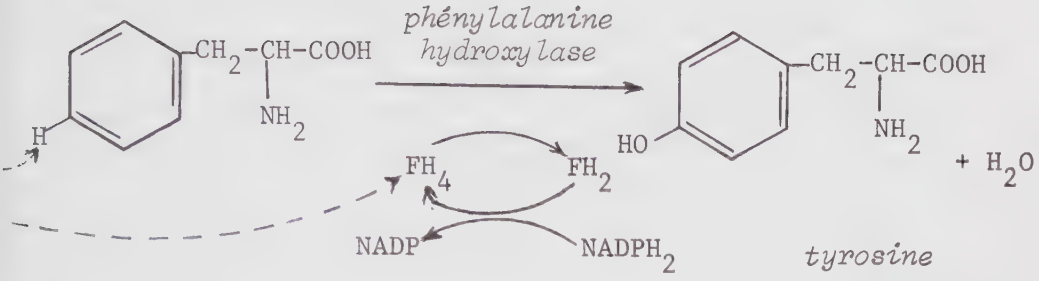
Cet acide phényl-pyruvique se forme normalement en faible quantité ; il passe dans les urines à la dose de quelques milligrammes par vingt-quatre heures. Une partie de cet acide subit une réduction et donne l'acide phényllactique, tandis qu'une autre partie est décarboxylée donnant l'acide phénylacétique éliminé sous forme conjuguée avec la glutamine (phényl-acétyl-glutamine). Il se forme également de l'acide benzoique (éliminé sous forme d'acide hippurique)et de l'acide m-hydroxyphényl-acrylique .





2°- Voie de la tyrosine

La majeure partie de la phénylalanine subit une hydroxylation en para grâce à une phénylalanine hydroxylase qui est constituée par deux systèmes enzymatiques distincts, fonctionnant en présence d'oxygène moléculaire, de fer, et de deux coenzymes : l'acide tétrahydrofolique transformé au cours de la réaction en acide dihydrofolique et le $NADPH_2$ qui, dans un second temps, redonne l'acide tétrahydrofolique par réduction de l'acide dihydrofolique .

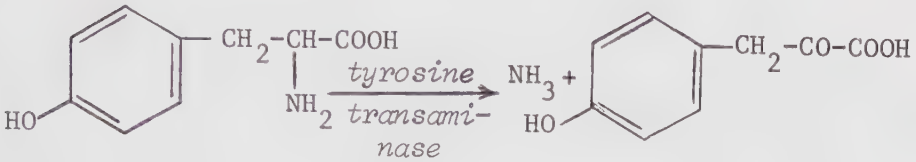


Ce système enzymatique est très spécifique de la L-phénylalanine : la D-phénylalanine et les homologues de la L-phénylalanine ne peuvent la remplacer comme substrat (UDENFRIED et COOPER) (89) . Et cependant la phénylalanine hydroxylase est susceptible d'hydroxyler le tryptophanne en 5-hydroxy-tryptophanne .

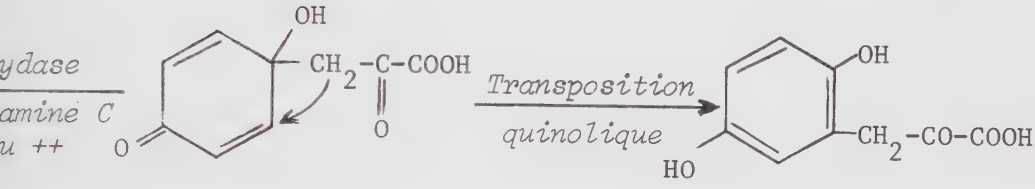
La tyrosine n'est pas indispensable si on apporte de la phénylalanine qui lui donne naissance . En l'absence de phénylalanine, elle devient indispensable . La tyrosine a un métabolisme très actif . Elle est le point de départ des hormones thyroïdiennes, des catécholamines, des mélanines . Elle subit en outre une dégradation qui la transforme en acide acétyl-acétique (et par là, elle est cétogène) et en acide fumarique qui rejoint le cycle de Krebs .

Voici résumées dans un tableau chacune des voies du métabolisme de la tyrosine .

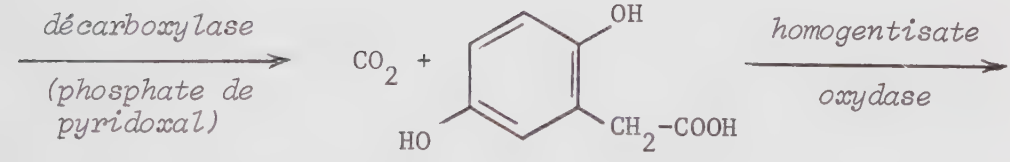
a) Catabolisme de la tyrosine en acide acétyl-acétique et en acide fumarique :



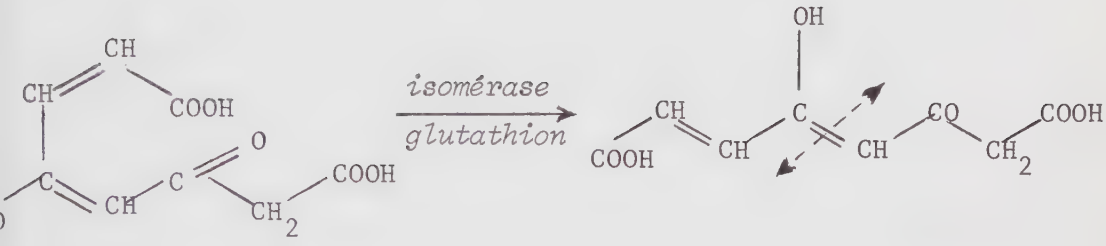
tyrosine — *acide para-hydroxy phénylpyruvique*



quinol — *acide 2-5-dihydroxy-phénylpyruvique*

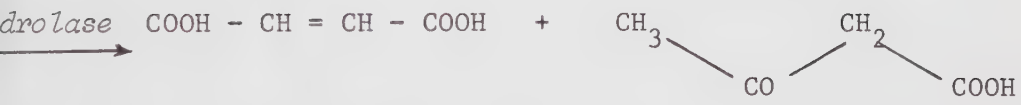


acide homogentisque



ide maléyl-acétyl acétique
(forme cis)

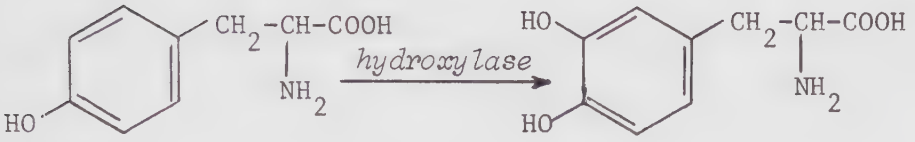
acide fumaryl
acétyl acétique



acide fumarique
↓
cycle Krebs

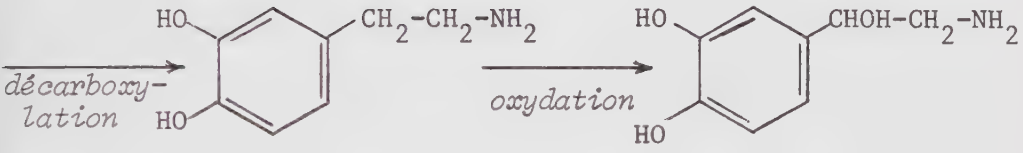
acide acétylacétique
(→ corps cétoniques)

b) Passage de la tyrosine aux catécholamines



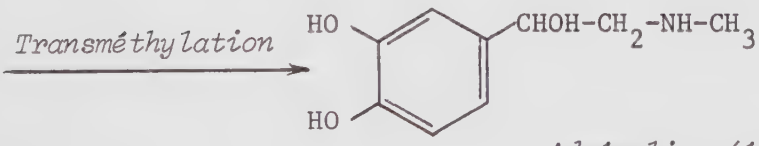
tyrosine

Dihydroxy-phénylalanine
D O P A



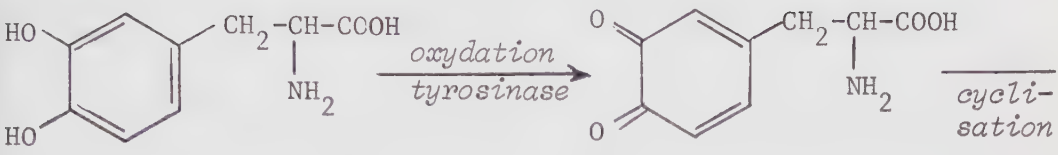
dopamine
(dihydroxy-phényléthylamine)

Noradrénaline



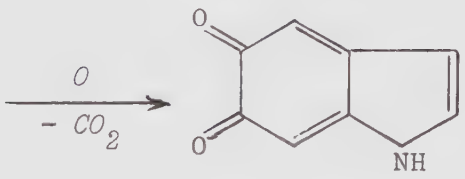
Adrénaline (éliminée sous forme d'acide Vanil mandélique dans urine)

c) Passage aux mélanines



DOPA

DOPACHROME



indol quinone

↓ *polymérisation*

MELANINES

L'absence de tyrosinase caractérise une maladie congénitale(transmise selon le mode récessif) l'albinisme .

d) Biosynthèse des hormones thyroïdiennes: elle a lieu par l'intermédiaire des dérivés iodés .

3°- La troisième voie normale de métabolisme de la phénylalanine est la décarboxylation .

L'amine qui prend naissance de la phényléthylamine , est douée de propriétés convulsivantes et possède de plus des effets toxiques sur le développement du cerveau .

Troubles du métabolisme de la phénylalanine :

Le trouble métabolique de cet acide aminé intéresse l'hydroxylation de la phénylalanine en tyrosine . Cette impossibilité de transformation de la phénylalanine en tyrosine, due à l'absence de phénylalanine hydroxylase, qui catalyse normalement cette réaction, a pour conséquence une augmentation de la phénylalanine dans le sang; alors que chez l'homme normal, à jeûn, il n'existe que des quantités infimes de phénylalanine dans le sang, 1 à 3 mg p. ^{100} , chez le malade présentant ce trouble métabolique, on rencontre des quantités appréciables de cet amino - acide, jusqu'à 25 et 40 mg pour 100 ml de sérum (DELAY et coll.) (13) . Le liquide céphalo-rachidien contient aussi des taux importants de phénylalanine . Cet excès de phénylalanine plasmatique joue un rôle toxique sur le tissu nerveux en voie de maturation . L'organisme se défend contre cette hyperphénylalaninémie par une augmentation de l'élimination de phénylalanine dans les urines et par une exagération de la voie de dégradation qui conduit à l'acide phénylpyruvique et à ses dérivés .Il apparaît alors, dans les urines, une quantité importante de dérivés phénylcétoniques qui, normalement n'existent qu'en quantité infime : c'est la phénylcétonurie . Un caractère biochimique très important réside dans l'élimination de dérivés ortho-hydroxylés de la phénylalanine et notamment l'acide O-hydroxy-phényl-acétique, décelable par chromatographie, qui proviendrait vraisemblablement de l'hydroxylation en ortho de l'acide phénylpyruvique .

La voie de la tyrosine étant bloquée, tous les dérivés auxquels elle donne naissance font défaut ou sont diminués : hormones thyroïdiennes, catécholamines, mélanines en particulier . Cet acide aminé devient alors indispensable . On note également une augmentation du dérivé de décarboxylation de la phénylalanine .

On observe en outre une perturbation du métabolisme du tryptophanne car la phénylalanine-hydroxylase peut également catalyser l'hydroxylation du tryptophanne en 5-hydroxy-tryptophanne . Tous les dérivés de la voie du 5-OH-tryptophanne (sérotonine et ses dérivés de dégradation en particulier l'acide 5-hydroxy-indol - acétique) sont diminués au profit des autres voies de catabolisme du tryptophanne (voie des indols, voie de la cynurénine (PARE (70) et MCGEER (59)) . Le rôle de la diminution de la sérotonine dans le plasma a été retenu comme pouvant être un élément déterminant dans l'apparition de l'arriération mentale et des troubles neurologiques, cette amine jouant un rôle important dans le métabolisme de la cellule cérébrale . La présence constante d'arriération mentale au cours de cette affection métabolique lui a valu le nom d'oligophrénie phénylpyruvique .

Historique et étude génétique :

La phényl cétonurie est la plus fréquente des encéphalopathies qui résultent d'un trouble du métabolisme des acides aminés . Elle atteint 1 p. ^{100} des sujets internés (HARRIS) (31) . Sa fréquence est estimée de 1 pour 10.000 à 1 pour 20.000 selon les auteurs . C'est une maladie héréditaire : elle se comporte comme un caractère mendélien récessif . Les malades naissent de parents apparemment normaux . Les parents sont d'ordinaire des hétérozygotes, porteurs du gène récessif de la maladie . Les enfants, nés de leur union, ont deux chances sur 4 d'hériter d'un seul gène anormal (donc d'être comme eux des hétérozygotes apparemment normaux), 1 chance sur 4 de n'avoir hérité que des gènes normaux et 1 chance sur 4 d'avoir reçu les deux gènes pathologiques (et d'être des homozygotes atteints de la maladie) . La fréquence des hétérozygotes dans la population est de 1 sujet

50 . Ces hétérozygotes sont apparemment normaux. Cette maladie fut découverte par FOLLING en 1934 (18) (19), qui la décrivit sous le nom de "imbecillitas Phenyl pyruvic" . Cet auteur avait eu son attention attirée par l'odeur caractéristique de l'urine de ces malades, odeur musquée, pénétrante, de souris ou de paille pourrie : il réussit à caractériser, dans l'urine de dix d'entre eux, l'acide phénylpyruvique . Puis, en 1935, PENROSE (72) décrit deux nouveaux cas en Angleterre . Quelques années plus tard, en 1937 et 1939, paraissent deux mémoires fondamentaux de JERVIS (39) (40) qui avait examiné plus de 20.000 oligophrènes parmi lesquels il avait identifié 1 p. 100 de phénylcétonuriques . FÖLLING (20) réussit à mettre en évidence la présence de corps cétoniques dans les urines grâce à la coloration verte qu'ils donnent avec le chlorure ferrique . Depuis, cette maladie porte le nom de maladie de Fölling et la technique d'identification qu'il a décrite est universellement connue et utilisée .

Etude clinique :

Cette affection a fait l'objet d'un très grand nombre de publications . Nous ne citerons que les plus récentes (DELAY, DESGREZ) (13), PONTE, NUYTS (78) . Les sujets atteints de ce trouble métabolique sont normaux à la naissance et le restent pendant quelques semaines . Dans la majorité des cas, ces enfants ont la peau très claire, les yeux bleus; généralement leurs cheveux sont blonds , très peu pigmentés (cette absence de pigmentation résulterait d'une diminution des mélanines) . Les troubles cutanés sont fréquents . Les signes neurologiques (crises convulsives), les troubles caractériels, l'arriération psychique sont néanmoins très précoces et s'aggravent avec l'âge en l'absence de thérapeutique : 75 p. 100 des sujets atteints de cette tare sont de grands idiots, 2 à 3 p. 100 des malades sont simplement débiles .

Chez les malades non traités, la dégradation intellectuelle progresse très rapidement mais si l'on supprime la phénylalanine de l'alimentation, tous les signes cliniques régressent (lésions cutanées, troubles du

caractère, convulsions) et, bien plus, si la suppression intervient dès les premiers jours de la vie, on peut obtenir un développement intellectuel normal . Il est donc capital de déceler dès que possible le trouble métabolique pour restreindre la phénylalanine ; c'est pourquoi de très nombreux tests ont été mis au point, ayant pour but un dépistage systématique de l'affection chez tous les nouveau-nés . Un test micro-biologique décrit par GUTHRIE (28) dès 1963, est utilisé sur une grande échelle dans tous les pays du monde pour un premier dépistage dès la naissance . C'est une méthode simple, basée sur l'utilisation de la croissance d'une souche de Bacillus subtilis (A T C C 6633) dépendante en phénylalanine, acide phénylpyruvique et acide phényllactique . Ce test consiste à déposer, sur le milieu ensemencé par le Bacillus subtilis, dont la pousse a été inhibée par un analogue structural de la phénylalanine (la β 2-thiénylalanine) des disques de papier filtre imprégnés d'urine ou de sang :après incubation à 37°C, des zones de croissance apparaissent autour du disque , leur diamètre est proportionnel à la quantité de phénylalanine qui a diffusé dans le milieu . On admet à l'heure actuelle que le taux limite en phénylalanine est de 4 p. $\frac{100}{}$ ml de sérum; au-delà, des examens complémentaires doivent intervenir et une exploration fonctionnelle complète s'impose . Cette exploration est également indispensable au cours du traitement de manière à vérifier de façon permanente le métabolisme de cet acide aminé .

B_/ EXPLORATION FONCTIONNELLE

1°- Exploration statique .

Cette exploration comporte essentiellement l'identification et le dosage de l'acide phénylpyruvique dont la recherche est à la base du diagnostic, puis le dosage de la phénylalanine dans l'urine et dans le sang .

a) Recherche de l'acide phénylpyruvique dans l'urine .

Il existe de très nombreuses méthodes (VIZET) (90) . Deux techniques-chimiques sont utilisées :

1- La réaction au perchlorure de fer :

L'acide phénylpyruvique, en présence de perchlorure de fer, donne une coloration verte . Décrite par FOLLING en 1934 (19), cette réaction est toujours utilisée mais de nombreuses causes d'erreur peuvent survenir : (PICAUD) (75) . Tout d'abord, les phosphates peuvent empêcher la coloration en donnant un complexe avec le fer . Il faut utiliser, pour éviter cet inconvénient, un excès de réactif et un tampon à pH acide . De même la présence d'urobiline en quantité notable inhibe la coloration, le pigment biliaire donnant une fausse coloration . Enfin d'autres corps cétoniques peuvent donner des colorations parasites et masquer la coloration propre de l'acide phénylpyruvique : c'est ainsi que l'acide acétyl acétique éliminé au cours du diabète ou du jeûne glucidique donne une coloration rouge, que les métabolites cétoniques de la valine et de la leucine qui caractérisent la maladie du sirop d'érable, donnent une coloration bleu gris . D'autres dérivés de l'acide pyruvique, comme l'acide imidazolylpyruvique qui caractérise un trouble du métabolisme de l'histidine, donnent la même coloration verte que l'acide phénylpyruvique . Enfin et surtout, des composés phénoliques d'origine médicamenteuse donnent des colorations qui masquent celle de l'acide phénylpyruvique (le P.A.S., l'aspirine , l'acide salicylique) . Il existe des papiers réactifs (Phenistix) à base de sulfate ferrique ammoniacal, de sulfate de magnésium et d'acide cyclohexyl sulfamique , plus spécifiques .

2- Réaction à la dinitrophénylhydrazine (POLONOVSKI et COLIN) (77) .

Cette réaction doit être réalisée sur l'urine filtrée et diluée au demi : à 2,5 ml d'urine diluée au demi , on ajoute 1 ml de solution de dinitro 2-4 phénylhydrazine dans HCl 2 N, et, au bout de trente minutes, on voit apparaître un précipité jaune de dinitro phényl hydrazone .

b) Recherche et dosage de la phénylalanine

1- Dans l'urine :

On a recours à la chromatographie sur papier, selon la technique classique décrite dans le premier chapitre.

La chromatographie peut être rendue semi-quantitative par l'utilisation d'une gamme étalon de phénylalanine .

2- Dosage de la phénylalanine dans le sang :

Il existe un grand nombre de méthodes de dosage. Nous avons utilisé une méthode colorimétrique basée sur la réaction de Kapeller et Adler dans laquelle la phénylalanine nitrée réagit sur l'hydroxylanine (méthode de HENRY (R.S.), SOBEL (C) et CHIAMORI (N) (35) décrite par GERMAN (A.) JEANMAIRE J. et BRISSAUD(H. E.)(24) . Nous avons opéré de la façon suivante :

- La réaction s'effectue sur 2 ml de sang . Après défécation par 10 ml d'acide picrique (solution d'acide picrique à 1 p. 100), on fixe la phénylalanine sur résine Dowex (50x8200, 400 mesh) : on fait passer 10 ml de filtrat perchlorique acidifié à pH 1, avec de l'acide chlorhydrique , sur une colonne remplie de résine Dowex, lavée au préalable à l'acide chlorhydrique, puis à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un éluat neutre . La phénylalanine est ensuite éluée par 15 ml d'ammoniaque NH_4OH 2N . Après évaporation de l'éluat, au bain-marie bouillant, la phénylalanine

est nitrée par addition de 0,4 ml de solution de nitrate de potassium (à 30 p. 100) dans l'acide sulfurique concentré. Ce réactif a pour effet d'oxyder et de nitrer la phénylalanine, cette étape est réalisée au bain-marie bouillant pendant 20 minutes. Après refroidissement dans la glace, on ajoute successivement 2,5 ml d'eau distillée glacée et cinq minutes après 0,5 ml de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 30 p. cent. Enfin après cinq minutes d'attente, on ajoute 2 ml d'ammoniaque concentré.

Une coloration violette apparaît que l'on lit au spectrophotomètre, quarante-cinq minutes après, à λ = 555 nm. On a préparé de la même façon un témoin (1 ml de solution étalon), et un blanc de réactifs (la solution étalon est une solution de phénylalanine dans l'acide chlorhydrique 0,1 N à 34 mg pour 100 ml).

$$\text{Calcul} = \frac{0,34 \times \text{Densité du dosage} \times 12 \times 100}{\text{Densité optique de l'étalon} \times 10 \times 2}$$

mg de phénylalanine pour 100 ml de sérum.

Il existe d'autres techniques que nous n'avons pas utilisées, en particulier une méthode fluorimétrique de MCCAMAN (M. W.) et ROBINS (E.) (57) basée sur la fluorescence du mélange phénylalanine ninhydrine en présence de L leucine L alanine qui exalte la fluorescence.

Cette méthode est précise et paraît à l'heure actuelle la technique de choix ; la technique colorimétrique est d'exécution plus longue et minutieuse, mais présente l'avantage de pouvoir être réalisée par tout laboratoire muni d'un spectrophotomètre. Il faut également citer une technique enzymatique qui utilise la L amino-acide oxydase de venin de crotale, intéressante car elle peut être adaptée en microméthode (LA DU et MICHAEL et LA DU, HOWELL et coll.) (50) (51).

Pour terminer, nous citerons les techniques de chromatographie monodimensionnelle ou bidimensionnelle (BERRY H. K.) (4), que l'on peut rendre semi-quantitatives par élution des taches de phénylalanine et comparaison avec une solution étalon de cet acide aminé .

L'exploration statique doit être complétée par un dosage de tyrosine dans le sang et une chromatographie des acides aminés du sang et de l'urine .

Les épreuves statiques permettent de dépister les sujets atteints de l'affection. Mais cette maladie métabolique a les caractères de l'hérédité récessive : les parents, apparemment normaux, sont des hétérozygotes porteur du gène récessif de l'affection . Les dosages de phénylalanine sont apparemment normaux chez eux. Mais ils peuvent être dépistés par l'épreuve dynamique :épreuve de charge en phénylalanine .

2°-Méthodes d'exploration dynamique :

Les épreuves de charge ont pour but d'éprouver les capacités de l'organisme à métaboliser un apport exogène supplémentaire d'un acide aminé déterminé . Dans les phénylcétonuries on pratique surtout les épreuves de charge en phénylalanine et plus rarement les épreuves de charge en tryptophanne .

Avant de pratiquer l'exploration dynamique , il est recommandé de réaliser une chromatographie des acides aminés urinaires .

- Technique de l'épreuve de charge en phénylalanine:

Nous avons utilisé la technique de BERRY et coll. (5) rapportée par LELUC (R.), LEMONNIER (A.), CHARPENTIER (C.), THUONG-CONG-TRIEU (53) . Avant l'épreuve, on prélève le sang témoin sur lequel on dose l'acide aminé . Puis l'on fait ingérer au malade 100 mg de L phénylalanine par kilo de poids . Trois prises de sang sont ensuite effectuées au bout d'une heure , deux heures et quatre heures . On recueille également après surcharge, les urines de vingt-quatre heures pour réaliser une chromatographie .

Le dosage de la phénylalanine sur les différents échantillons du sang permet de tracer la courbe d'élimination en fonction du temps . Chez les sujets normaux, le maximum est observé au bout d'une heure et le retour à la normale au bout de la quatrième heure (le taux moyen dans le plasma au bout d'une heure est de 7, 4 mg p. 100) . Chez les hétérozygotes, le taux initial de phénylalanine est généralement normal mais la courbe présente un maximum plus élevé (13, 4 mg p. 100) et une décroissance beaucoup plus lente (JOB(J. C.), BURI (J. F.)) (42), tandis que le malade présente une flèche d'hyperphénylalaninémie plus élevée encore ; la courbe d'hyperphénylalaninurie est habituellement deux fois plus élevée que la courbe normale chez les hétérozygotes .

Nous donnons un exemple de courbes obtenues chez les sujets normaux et hétérozygotes, d'après BERRY (5) (figure 19) .

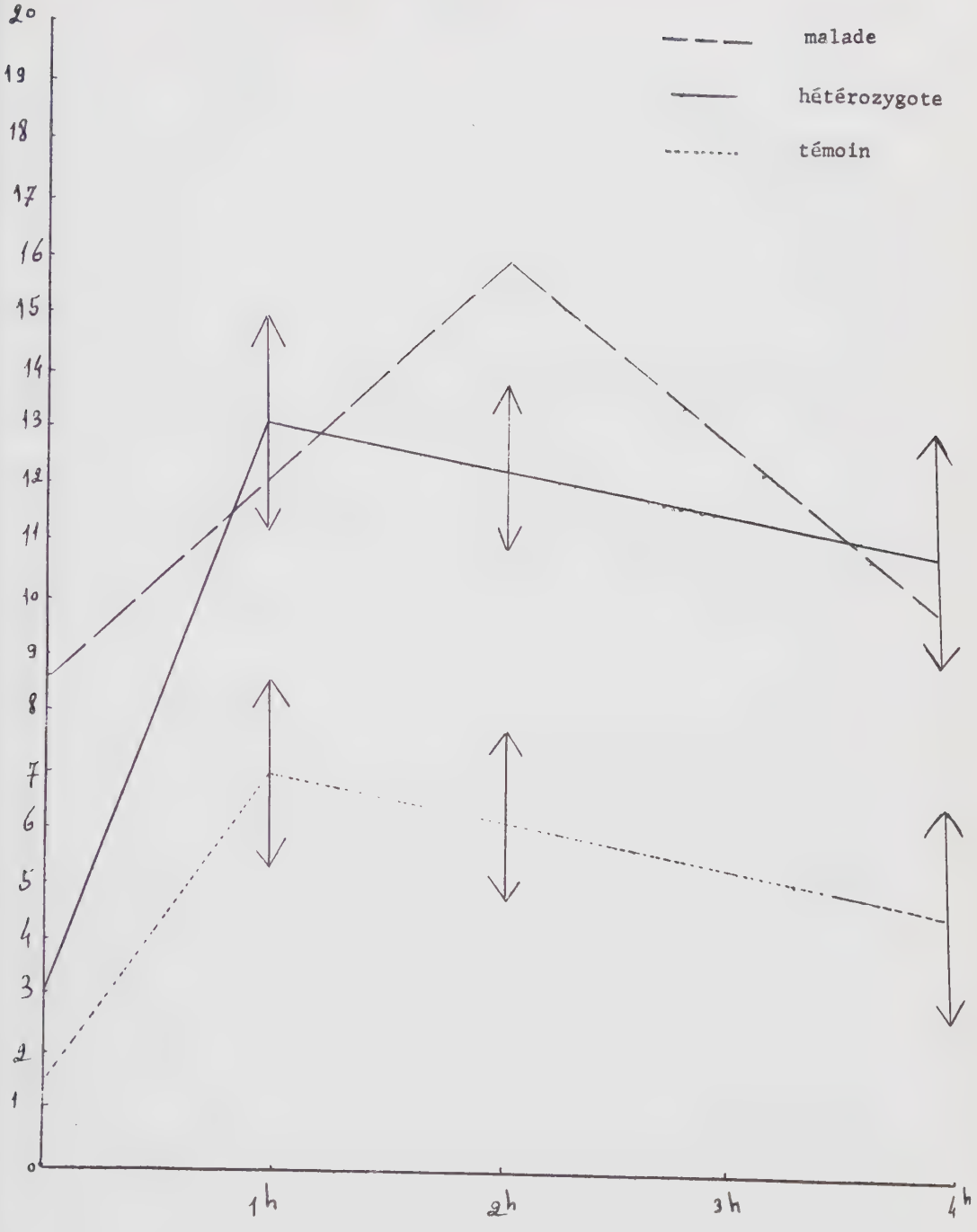


Figure 19 - Courbe de témoins et d'hétérozygotes
d'après BERRY. (5)

Cette épreuve de surcharge présente un intérêt tout particulier dans les formes frustes de l'affection (MOZZICONACCI, ATTAL) (63) (64) . Dans certains cas, où l'atteinte intellectuelle est limitée, le taux de phénylalanine sanguin est peu augmenté, les urines ne contiennent pas d'acide phénylpyruvique : seule l'épreuve de charge est alors capable de démontrer la réalité du trouble métabolique .

Chez le sujet normal, l'ingestion de L phénylalanine ne détermine pas de phénylcétonurie (PENROSE) (72) . Chez l'oligophrène, on constate une augmentation considérable de l'acide phénylpyruvique .

En conclusion, si l'exploration biochimique de l'oligophrénie phénylpyruvique repose essentiellement sur la recherche de l'acide phénylpyruvique dans l'urine, l'épreuve de charge est nécessaire pour dépister les formes frustes et les hétérozygotes .

Traitement :

Le seul traitement est la prescription d'un régime pauvre en phénylalanine . Tous les autres essais thérapeutiques ont échoué (BERGER) (3) . L'administration prolongée de tyrosine et à fortes doses n'entraîne aucune amélioration, si ce n'est une modification de la couleur des cheveux . La pyridoxine améliore les perturbations du métabolisme du tryptophanne chez les phénylcétonuriques (HEELEY) (32) . De même les tentatives effectuées pour augmenter le taux de sérotonine ont échoué (en particulier les inhibiteurs de la mono-amine-oxydase, dont l'utilisation n'est pas dépourvue de danger puisqu'ils augmentent le taux de phényléthylamine) .

On diminue donc l'apport exogène de phénylalanine en utilisant essentiellement des hydrolysats de caséine débarrassés de la plus grande partie de leur phénylalanine . Ces préparations renferment en outre des graisses, des sucres, des sels minéraux, des vitamines (LOFENALAC) .

La conduite du traitement est délicate, car il faut ramener la phénylalaninémie à la normale . Il faut donc régler l'apport en phénylalanine sur le taux sanguin de cet acide aminé qui doit être de 3 à 8 mg pour 100 ml de sérum dans les six premiers mois de la vie . Pour qu'un traitement soit bien conduit, il faut réaliser des dosages régulièrement répétés de phénylalaninémie de manière à éviter non seulement une hyperphénylalaninémie, mais encore une hypophénylalaninémie qui peut être responsable d'un arrêt de croissance, d'une anémie, d'une sensibilité particulière aux infections, d'une hypoglycémie ou même d'une mort subite .

Cette alimentation est bien acceptée par les nourrissons, mais très difficilement acceptée par les plus grands enfants . La durée du traitement peut aller jusqu'à 10 ans .

C/ ETUDE D'UN CAS CLINIQUE

Nous reportons en détail un cas dépisté dans le service du Professeur VERGER .

Il s'agit d'un enfant âgé de deux ans, qui pèse 14 kg, et dont la taille est de 86 cm. Il est entré à l'Hôpital des Enfants pour trouble encéphalopathique . Cet enfant a présenté une coqueluche à l'âge d'un mois . Il ne marche pas, ne peut pas s'asseoir et ne tient pas sa tête, il ne suit pas les objets, ne sourit pas . Ses yeux sont noirs et ses cheveux châtains .

La chromatographie sur papier des acides aminés urinaires révèle une tache assez importante de phénylalanine (photo du chromatogramme) (figure 20) .

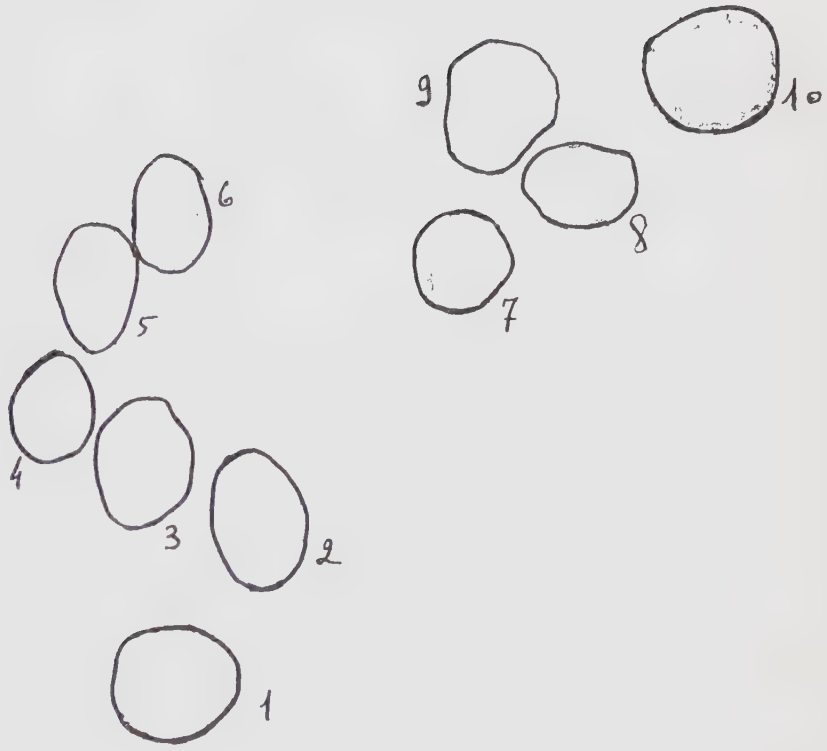


Figure 20 - Chromatographie urinaire de M..... Claude.

1 - Glycocolle.
2 - Alanine.
3 - Glutamine.
4 - Lysine.
5 - Histidine.
6 - Arginine.
7 - Acide 3 - Amino-butyrique.
8 - Norvaline.
9 - Acide pipecolique.
10 - Phénylalanine.

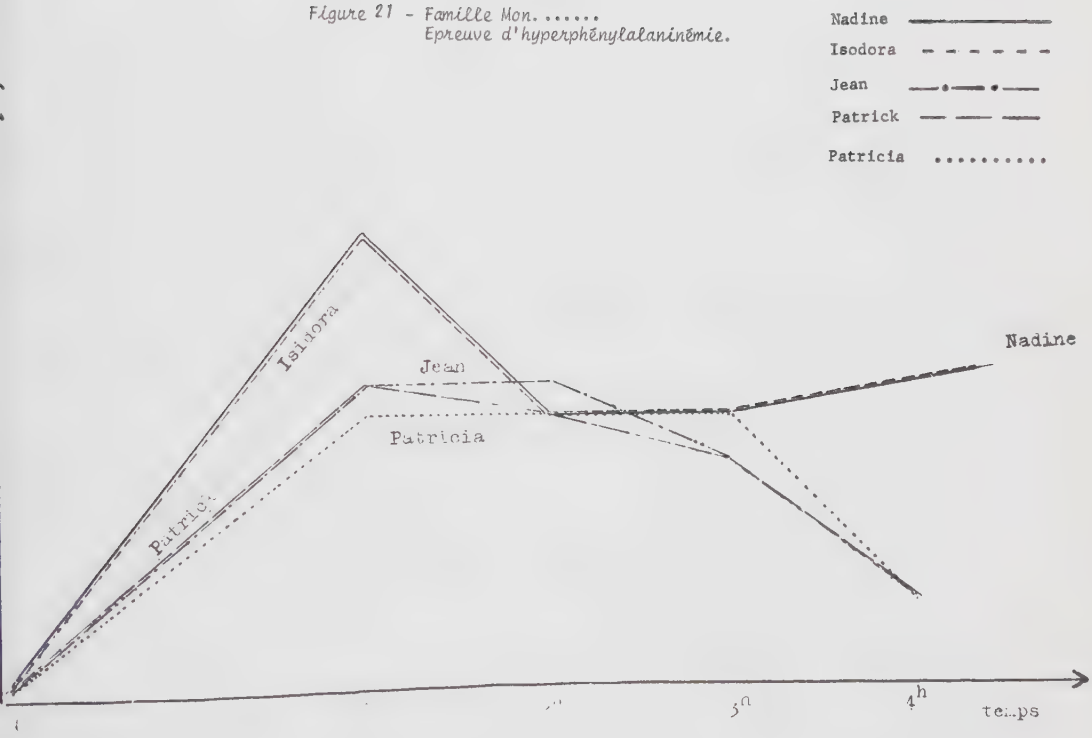
Le dosage global des acides aminés urinaires est de l'ordre de 336 mg pour mille, soit 5, 3 mg par kg et par vingt-quatre heures . L'hyper-amino-acidurie est légère mais on note une très nette hyperphénylalaninurie .

Le dépistage par test de Guthrie révèle une hyperphénylalaninémie : le taux de phénylalanine dans le sang est supérieur à 20 mg p. 100 . L'enfant est soumis alors à un régime diététique dépourvu de phénylalanine et à l'A. C. T. H. Vingt jours plus tard, nous avons réalisé un dosage de phénylalanine dans le sang par la technique de HENRY, SOBEL et CHIAMORI (35) et le résultat obtenu est de 12 mg pour 100 ml et un deuxième test de Guthrie (29) est encore positif .

Une enquête est alors entreprise chez les parents, les frères et les sœurs . Les deux sœurs âgées de 4 et 5 ans sont blondes, tandis que les parents sont bruns . Une épreuve de surcharge en phénylalanine suivie d'un dosage de phénylalaninémie toutes les heures révèle que la mère (Isodora) et la plus jeune sœur (Nadine) seraient hétérozygotes . La flèche d'hyperphénylalaninémie est beaucoup plus élevée que chez les autres enfants et que chez le père (20 mg au lieu de 10 à 12 mg p. 100) et le temps nécessaire au retour à la valeur de départ de la phénylalaninémie est très supérieur à quatre heures . Le père et les autres enfants paraissent normaux (21) .

Après deux mois de régime pauvre en phénylalanine, un dosage de phénylalanine dans le sang donne comme résultat un chiffre inférieur à 4 mg pour 100 ml. On ajoute alors au régime alimentaire une quantité croissante de phénylalanine, de manière à maintenir le taux de cet acide aminé en 4 et 6 mg p. 100 . La durée du traitement n'est pas suffisamment grande pour tirer une conclusion de l'effet de la réduction de la phénylalanine dans le régime sur les signes cliniques dont cet enfant était atteint . Toutefois l'amélioration de l'état psychique a été très sensible dès l'instauration du traitement diététique .

Figure 21 - Famille Mon.....
Epreuve d'hyperphénylalaninémie.



CONCLUSIONS GENERALES

Le travail que nous présentons aujourd'hui apporte une contribution expérimentale à l'étude de l'exploration fonctionnelle des aminoacides .

L'hôpital dans lequel nous travaillons nous a permis d'étudier plus spécialement les aminoacides suivants :

a) hydroxyproline

b) histidine

c) tryptophanne

d) phénylalanine .

Hydroxyproline - Nous avons apporté une importante modification à la technique classique, que nous avons ainsi rendue à la fois plus précise et plus fidèle . Grâce à cette méthode, nous avons réalisé une étude de l'exploration du métabolisme calcique, particulièrement adaptée aux troubles du rachitisme .

Histidine - Plusieurs auteurs ont décrit les rapports qui semblent exister entre les carences en acide folique et l'élimination d'un métabolite de l'histidine (FIGLU).

Désirant vérifier le bien-fondé de ce rapport, nous avons effectué une expérimentation sur l'animal carencé et nous avons pu mettre ainsi en évidence l'exactitude de cette assertion .

Tryptophanne - La pathologie du métabolisme du tryptophanne a été étudiée . Nous rapportons trois observations en relation avec l'exploration du métabolisme de cet aminoacide .

Phénylalanine - Nous avons eu la chance de pouvoir effectuer des recherches sur les troubles du métabolisme de cet aminoacide chez les divers membres d'une même famille . Cela nous a permis de confirmer les caractères génétiques de ces troubles .

Ce travail apporte donc une contribution à l'étude si complexe du métabolisme de ces divers acides aminés . Il permet d'envisager, dans tout laboratoire non équipé d'analyseur automatique d'acides aminés, la possibilité de dépistage et même l'étude complète de certaines perturbations du métabolisme d'acides aminés avec la perspective très intéressante de réaliser un diagnostic précoce d'affections pour lesquelles le pronostic dépend essentiellement de la rapidité de leur identification .

B I B L I O G R A P H I E

1 - ASATOOR (A.M) , CRASKE (J), LONDON (D.R) et MILNE (M.D) - Indole production in Hartnup disease. Lancet, 1963, 1, 126.

2 - BARON (D.N) , DENT (C.E) , HARRIS (H), HART (E.W) et JEPSON (J.B) - Hereditary pellagralike skin rash with temporary cerebellar ataxia, constant renal aminoaciduria, and other bizarre biochemical features. Lancet, 1956, 2, 421.
1960, 2, 1384.

3 - BERGER (R) et BROYER (M) - Phénylcétonurie. Presse méd., 1968, 19, 915.

4 - BERRY (H.K) - Paper chromatographic method for estimation of phenylalanine. Proc. Soc. exp. Biol., 1957, 95, 71.

5 - BERRY (H.Y) , SUTHERLAND (B.S) et UMBARGER (B) - Diagnosis and treatment : interpretation of results of blood screening studies for detection of phenylketonuria. Pediatrics, 1966, 33, 102.

6 - BESSEY (O.A) , ADAM (D.S.D) et HANSEN (A.E) - Intake of vit B6 and infantile convulsions a first approximation of requirements of pyridoxine in infants. Pediatrics, 1957, 20, 33.

7 - BIEHL (J.P) et VILTER (R.W) - Effect of isoniazide on vit B6 metabolism. Proc. Soc. exp. Biol., 1954, 85, 389.

8 - BIZERTE (G), PAYSANT (P) et BOULANGER (P). - Chromatographie de partage sur papier des acides aminés urinaires. Path. Biol., 1959, 7, 1529.

9 - BLOCK (R.J) - Paper chromatography and paper electrophoresis. Academic press inc. Publishers. New-York, 1958, p 22.

10 - BOULANGER (P), BIZERTE (G) et COURTOT (F) - Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques III - Amino-acides et peptides urinaires. Bull. Soc. Chim. biol., 1952, 34, 366.

11 - COTTE (J), CHETALLE (M), POULET (F) et CHRISTIANSEN (J) - Méthode de séparation chromatographique bidimensionnelle sur couche mince des métabolites de Tryptophanne. J. Chromatog., 1965,19,312.

12 - DALGLIESCH (C.E) - Two dimensional, paper chromatography of urinary Indoles and related substances. Biochem. J., 1956, 64, 481.

13 - DELAY (J), PICHOT (P) et DELBARRE (F) - L'oligophrénie phénylpyruvique. Sem. Hôp. Paris, 1947, 27, 1749.

14 - DELZENNE (J) et AYMARD (P). - L'acide formiminoglutamique ou F.I.G.L.U. Gaz. méd. de France,1968, 75, 25.

15 - DENT (C.E) . - Etude utilisant la chromatographie sur papier. Biochem. J., 1947, 41, 240.

16 - DENT (C.E) - A study of the Behaviour of some Sixty amino-acids and other Ninhydrin-reacting substances on Phenol - collidine Filter-paper chromatograms , with notes as to the occurence of some of them in biological fluids. Biochem. J., 1948, 43, 169.

17 - FILLIAT (M), COTTE (J) et BRUNET (M) - Méthode de dosage de l'Hydroxyproline urinaire. Path. Biol., 1966, 763.

18 - FOLLING (A) - Utkillelse av fenylpyrodruesyre i urinen som stofshrifte-anomali i forbindelse med Imbecilitet. Nor. Med. tidskr., 1934, 8, 1054.

19 - FOLLING (A) - Ueber Ausscheidung von phenyhrenztraubensäure in den als Stoffwechselanemalie in Verbindung mit Imbezilität. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 1934, 227, 169.

20 - FOLLING (A) und CLOSS (K) - Ueber das Vorkommen Von I-Phenylalanine in Harn und Blut bei imbecilitas phenylpyruvica. Ztschr. physiol. Chem., 1938,254, 115.

21 - FREY (J) - Etude d'une méthode d'expolaration et du taux normal de l'Hydroxyproline du sérum. Biochim. biophys. Acta., 1965, 111, 440.

22 - FREZAL (J), REY (J), JARLIER (H) et LAMY (M). - L'excrétion de l'acide formiminoglutamique (ou F.I. G.L.U.) chez le nourrisson normal et dans les stéatorrhées par trouble de l'absorption intestinale. Rev. franç. Etud. clin. biol., 1964, 9, 38.

23 - GERBER (G), GERBER (G) et ALTMAN (K.I) - Studies on the metabolism of tissue proteins. J. biol. Chem., 1960, 235, 2653.

24 - GERMAN (A), JEANMAIRE (J) et BRISSAUD (H.E) - Dosage de la Phénylalanine dans le sang. Etude comparative des méthodes colorimétrique, fluorimétrique et microbiologique. Ann.Biol.clin.,1967,25,835.

25 - GIANETTO (R) et BOUTHILLIER (L.P) - The metabolism of DL-Hydroxyproline-2-C^{14} in the rat. Canad. J. Biochem. Physiol., 1954, 32, 154.

26 - GOTTLIEB (A.A) , KAPLAN (A) et UDENFRIEND (S) - Further evidence for the accumulation of a Hydroxyproline-deficient, collagenase-degradable pro - tein during collagen biosynthesis in vitro. J. biol. Chem., 1966, 241, 1551.

27 - GREENBERG (L.D) - Xanthurenic acid excretion in the human subject on a pyridoxine deficient diet. Arch. Biochem., 1949, 21, 237.

28 - GUTHRIE (R) et SUSI (A) - A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics,1963 32, 338.

29 - GUTHRIE (R) et WHITNEY (S) - Phenylketonuria-Detection in the newborn infant as a routin hospital procedure. Children's Bureau Publication, 1964, 419, U S Dept of Health Education and Welfare.

30 - HAN (K.K) - Acides aminés des liquides d'ascite (Bilan qualitatif et quantitatif, Etudes de quelques formes combinées d'aminoacides). Thèse Doct. Sc. Nancy, 1961.

31 - HARRIS (H) - Biochimie Génétique Humaine, Masson et Cie Edit. Paris, 1963.

32 - HEELEY (A.F) - The effect of pyridoxine on Tryptophan metabolism in phenylketonuria. Clin. Sci., 1965, 29, 465.

33 - HENDERSON (L.M) , KOSKI, RUTH (E.T) and DANGELI (F) - The role of riboflavin and vit B6 in Tryptophan metabolism. J. biol. Chem., 1955, 215, 369.

34 - HENNEQUET (A), LYON (G), DEBRIS (P) et LE BALLE (J.C) Les crises convulsives pyridoxino-sensibles du nouveau-né et du nourrisson. Sem. Hôp. Paris, (Ann. Pédiat.,), 1959, 35, 1411/P, 197.

35 - HENRY (R.J) , SOBEL (C) and CHIAMORI (N) - Method for determination of serum Phenylalanine with use of the Kapeller-Adler reaction. Amer. J. Dis. Child., 1957, 94, 604.

36 - JEPSON (J.B) - Paper chromatogrphy or urinary indoles. Lancet, 1955, 2, 1009.

37 - JEPSON (J.B) et SMITH (I) - Multiple dipping procedures in paper chromatography a specific test for Hydroxyproline. Nature, 1953, 172, 1100.

38 - JEROME (H), LEJEUNE (J) et TURPIN (R) - Etude de l'excrétion urinaire de certains métabolites du Tryptophanne chez les enfants mongoliens. C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 474.

39 - JERVIS (G.A) - Phenylpyruvic Oligophrenia. Introductory study of fifty Cases of mental deficiency associated with excretion of phenylpyruvic acid. Arch. Neur. Psychiat., 1937, 38, 944.

40 - JERVIS (G.A) - Phenylpyruvic - Oligophrenia : Deficiency of Phenylalanine oxydizing system. Proc. Soc. exp. Biol., 1953, 82, 514.

41 - JEUNE (M), COTTE (J), HERMIER (M), YASSEL (L) et Mme LERICHE - L'épreuve de charge en Tryptophanne comme moyen de détection des apyridoxinoses chez l'enfant. Pédiatrie, 1959, 14, 853.

42 - JOB (J.C) et BURI (J.F) - Maladie du système nerveux central liée à un trouble congénital du métabolisme des protides. Arch. franç. Pédiat., 1963,20,47.

43 - JOB (J.C) et BURI (J.F) - Maladie de HARTNUP. Arch. franç. Pédiat., 1963, 20, 60.

44 - JOHNSTONE (J.M) , KEMP (J.H) et HIBBARD (E.D) - A colorimetric method for the estimation of urinary formiminoglutamic acid. Clin. chim. Acta., 1965, 12, 440.

45 - JONES (C.R) , BERGMAN (M.W) , KITTNER (P.J) et PIGMAN (W.W) - Urinary Hydroxyproline excretion in normal children and adolescents. Proc. Soc. exp. Biol. 1964; 115, 85.

46 - JULIEN-MARIE (A), HENNQUET (G), LYON (I), DEBRIS (P), et LE BALL (J.C) - Les crises convulsives pyridoxino-sensibles du nouveau-né et du nourrisson. Sem. Hôp. Paris, Ann. Pédiat., 1959, 35, 1411/P, 197.

47 - JUN-BI-TU (M.D) et ZELLWEGER (H). - Blood serotonin deficiency in Downs syndrome. Lancet , 1965, 2, 715.

48 - KLEIN (L) - Urinary Hydroxyproline during late pregnancy and postpartum involution. Metabolism 1964, 13, 386.

49 - KLEIN (L) et CURTISS (P.H Jr) - In : Dynamic studies of metabolic bone disease . Blackxell Edit., Oxford, 1964.

50 - LA DU (B.N) , HOWELL (R), MICHAEL (P.J) and SOBER(E.K) A quantitative micromethod, for the determination of phenylalanine and Tyrosine in blood, and its application in the diagnosis of phenylketonuria in infants. Pediatrics, 1963, 31, 39.

51 - LA DU (B.N) and MICHAEL (P.J) - Enzymatic spectrophotometric method for the determination of phenylalanine in blood. J. Lab. clin. Med., 1960, 55, 491.

52 - LEACH (By A.A) - Notes on a modification of the NEUMAN and LOGAN method for the determination of the Hydroxyproline. Biochem. J., 1960, 74, 70.

53 - LELUC (R), LEMONNIER (A), CHARPENTIER (C) et THUONG-GONG-TRIEU - Les bases biochimiques et analytiques de l'exploration du métabolisme de la Phénylalanine. Sem. Hôp. Paris (Ann. Pédiat.),1964, 40, 643/p. 139.

54 - LEMONNIER (A), CHARPENTIER (C) et LELUC (R) - L'exploration du métabolisme du Tryptophanne. Sem. Hôp. Paris (Ann. Pédiat.), 1964, 40, 651/P,147.

55 - LEMONNIER (A), LELUC (R), in FAUVERT (R) et HARTMANN (L) - Techniques modernes de laboratoires, Expansion Scientifique française, Paris, 1963.

56 - LEPKOWSKY (S), ROBOZ (E) et HAAGAN-SMIT (A.J) - Xanthurenic acid and its role in the Tryptophan metabolism of pyridoxine deficient rats. J. biol. Chem., 1943, 149, 195.

57 - MCCAMAN (M.W) et ROBINS (E) - Fluorimetric method for the determination of Phenylalanine in serum. J. Lab. clin. Med., 1962, 59, 885.

58 - MCCOY (E.E) et CHUNG (S.I) - The excretion of Tryptophan metabolites following desoxypyridoxine administration in mongoloïd and non mongoloïd patients. J. Pediat., 1964, 64, 227.

59 - MCGEER (E.M) et TISCHLER (B) - Vit B6 in mental deficiency : xanthurenic acid excretion in phenylketonurics. Canad. Med. Ass. J., 1958, 78, 954.

60 - MEISTER (A) - Biochemistry of the amino acids. Academic press. Inc. publ. New-York, 1957.

61 - MICHL (H) - Monatsch. Chem., 1951, 82, 489. Cité par HAN (30).

62 - MITOMA (C), SMITH (T.F), DAVIDSON (J.D) , UDENFRIEND (S), DACOSTE (F.M.) and SJOERDSMA (A) - Improvements in methods for measuring Hydroxyproline. J. Lab. clin. Med., 1959, 53, 970.

63 - MOZZICONACCI (P), ATTAL (C), BOISSE (J) , PHAM-HUU-TRUNG, LELUC (R) et THUONG-CONG-TRIEU - Les formes (limite) de la phénylcétonurie. Sem. Hôp. Paris, (Ann. Pédiat.), 1964, 40, 665.

64 - MOZZICONACCI (P), BOISSE (J), LEMONNIER (A) et CHARPENTIER (C) - Les maladies métaboliques des acides aminés avec arriération mentale. 1 vol. 393 p., l'expansion scientifique française,édit. Paris, 1968.

65 - MUSAJO (D.L) et COPPINI (D) - La determinazione degli acidi chinurenico exanturenico. Experientia, 1951 7, 20.

66 - NEUBERGER (A) et SLACK (H.G.B) - The metabolism of collagen from liver, bone, skin and tendon in the normal rat. Biochem. J., 1953, 53, 47.

67 - NEUMAN (R.E) and LOGAN (A) - The determination of Hydroxyproline. J. Biol. Chem., 1950, 184, 299.

68 - O'BRIEN (D) et GROSHEK (A) - The abnormality of Tryptophan metabolism in children with mongolism. Arch. Dis. Child., 1962, 37, 17.

69 - OERIU (S), et TANASE (I) - Séparation et détermination de la Proline et Hydroxyproline, et de la 3-Hydroxyproline des produits biologiques, par chromatographie sur papier. Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 979.

70 - PARE (C.M.B) , SANDLER (M) and STACEY (R.S) - Decreased 5-HO-Tryptophan decarboxylase activity in phenylketonuria. Lancet, 1965, 2, 7056.

71 - PARTRIDGE (S.M) et WESTALL (R.G) - Filter-paper partition chromatography of sugars. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg White and foetal blood of sheep. Biochem. J., 1948, 42, 241.

72 - PENROSE (L.S) et QUASTEL - Metabolic studie in phenylketonuria. Biochem. J., 1937, 31, 266.

73 - PETERKOFSKY (B) et UDENFRIEND (S) - Conversion of Proline-C^{14} to peptide-Bound Hydroxyproline -C^{14} in a cellfree system from chick embryo. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1961, 6, 184.

74 - PHAM-HUU-TRUNG, BOISSE (J), ATTAL (C), CHARPENTIER (C), LEVY (H) et MOZZICONACCI (P) - L'épreuve de charge en Tryptophanne chez l'enfant. Sem. Hôp. Paris, (Ann. Pédiat.), 1964, 40, 673/P, 168.

75 - PICAUD (C) - Oligophrénie phénylpyruvique, ou phénylcétonurie. Thèse Méd. Lyon, 1961.

76 - PLAQUET (R),BISERTE (G) et BOULANGER (P) - Acides aminés et polypeptides des milieux biologiques. Forme combinée de proline, d'hydroxyproline et de Glycocolle de l'urine humaine. Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 393.

77 - POLONOWSKI (C) et COLIN (J) - Explorations biologiques en pédiatrie. L'expansion scientifique française, Paris, 1963, 591 p. (2ème éd.).

78 - PONTE (C), NUYTS (J.P.) et RYCKEWAERT (Ph) - L'oligophrénie phénylpyruvique. Méd. infant., 1967, 3, 199.

79 - PROCKOP (D.Y) et SJOERDSMA (A) - Significance of urinary hydroxyproline in man. J. clin. Invest., 1961, 40, 843.

80 - RAVENNI (G), RUBEGNI (M) et DEL GIOVANE (L) - Urinary excretion of Hydroxyproline in osteoporosis. Boll. Soc. Biol. Sper., 1962, 38, 877.

81 - ROSE (D.P) - Value of detection of formiminoglutamic acid in urine for the diagnosis of malabsorption states. Brit. med. J., 1962, I, 1031.

82 - SILVERMAN (W.A) - Screening of newborn infants for metabolic desease. Pediatrics, 1965 , 35 , 499.

83 - SJOERDMA (A), UDENFRIEND (S), KEISER (H) et LEROY (E.C) - Hydroxyproline and collagen metabolism clinical implications. Ann. intern. Med., 1965, 63, 672.

84 - STEGMANN (H) - Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. Hoppe Seyler's z physiol. Chem., 1958, 311, 41.

85 - STEIN (W.H) et MILLER (E.G) - The composition of elastin. J. biol. Chem., 1938, 125, 599.

86 - STETTEN (M.R) et SHOENHEIMER (R) - The metabolism of L-Proline studied wite the aid of deuterium and isotopic nitrogen. J. Biol. Chem., 1944, 153,113.

87 - TABOR (H), et WYNGARDEN (L) - A method for the determination of formiminoglutamic acid in urine. J. clin. Invest., 1958, 37, 824.

88 - TOMPSETT (S.L) - The determination in urine of some metabolites of Tryptophan kynurenine anthranilic acid and 3-HO-Anthranilic acid, and reference to the presence of ortho-amino-phenol in urine. Clin. chim. Acta, 1959, 4, 411.

89 - UDENFRIEND (S), and COOPER (J.R) - The enzymatic conversion of Phenylalanine to Tyrosine. J. biol. Chem., 1952, 194, 503.

90 - VIZET (J) - L'acide phénylpyruvique. Thèse Doct. Pharm. Bordeaux, 1953.

91 - ZALUSKI (H) et HERBER (T.V) - Urinary formiminoglutamic acid as test of folic acid deficiency. Lancet, 1962, 1, 108.

*

EDITIONS BERGERET- 2,rue Bergeret -BORDEAUX. Tél. 91.12.59

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - Techniques d'identification et de dosage des aminoacides urinaires 5

CHAPITRE II - Exploration fonctionnelle du métabolisme de l'hydroxyproline 18

A / Rappel métabolique 18
B / Exploration fonctionnelle 23
C / Etude clinique 27

CHAPITRE III - Exploration fonctionnelle des carences en acide folique : dosage de l'acide formimino glutamique 37

A / Rappel métabolique de l'histidine 38
B / Exploration fonctionnelle 42
C / Etude clinique 48
D / Expérimentation sur le lapin 56

CHAPITRE IV - Exploration fonctionnelle de certains aspects du métabolisme du tryptophanne 61

A / Rappel du métabolisme du tryptophanne 63
B / Exploration fonctionnelle 64
C / Etude clinique 67

CHAPITRE V - Exploration fonctionnelle des perturbations du métabolisme de la phénylalanine 73

A / Rappel métabolique 73
B / Exploration fonctionnelle 84
C / Etude d'un cas clinique 92

CONCLUSIONS 96

BIBLIOGRAPHIE 98